

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

**Estudio biológico de la inducción de Interferón Aviar por
distintos mixovirus**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Pilar Moya Esteve

DIRECTOR:

Emilio Ronda Lain

Madrid, 2015

Pilar Moya Esteve



X - 53 - 013023 - 0

ESTUDIO BIOLOGICO DE LA INDUCCION DE INTERFERON AVIAR
POR DISTINTOS MIXOVIRUS

Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1981



BIBLIOTECA

© Pilar Moya Esteve
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-17701-1981

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

ESTUDIO BIOLÓGICO DE LA INDUCCIÓN
DE INTERFERÓN AVIAR POR DISTINTOS
MIXOVIRUS

M E M O R I A

QUE, PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, PRESENTA

MA. PILAR MOYA ESTEVE

MADRID
DICIEMBRE, 1979

Antes de nada deseamos hacer constar
nuestro sincero reconocimiento a la Caja
de Ahorros y Monte de Piedad de Madrid por
la concesión de una Beca de Investigación
en Ciencias Biomedicas, que nos ha permiti-
do realizar la presente Memoria de Tesis
para optar al Grado de Doctor

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. D. Emilio Ronda Laín, por el gran interés puesto en mi formación científica y su constante apoyo y desvelo durante la dirección de la presente Memoria, sin cuya ayuda no hubiera sido posible la realización de la misma.

Igualmente, al Instituto de Inmunología y Biología Microbiana, en la persona de su Director Prof. Dr. D. Antonio Portolés Alonso, por su interés y ayuda, así como por los medios materiales puestos a mi disposición.

Asimismo, agradezco al Prof. Dr. D. Dimas Fernandez Galiano su amable aceptación en el patrocinio de esta Tesis.

Finalmente a mis compañeras Dra. M^a. Luisa Alonso Puertas, y Srtas. M^a. del Carmen Granados Crespo por su colaboración durante estos años de realización del presente trabajo, y a Dña. M^a. Luisa del Pozo que ha intervenido en el mecanografiado de la presente Memoria.

INTRODUCCION	1
------------------------	---

PARTE BIBLIOGRAFICA

I. SIGNIFICACION BIOLOGICA DE LOS INTERFERONES	3
1. <u>Sobre la síntesis de interferón</u>	4
1.1. <u>Virus activos e inactivados como inductores de interferón</u>	5
1.2. <u>Mecanismos de inducción de interferón</u>	7
1.3. <u>Mecanismo de acción</u>	11
1.4. <u>Síntesis y aparición de interferón "in vivo" e "in vitro"</u>	16
2. <u>Propiedades químicas del interferón</u>	25
3. <u>Aspectos biológicos de la interacción virus-interferón-huesped</u>	29
3.1. <u>Acción inhibidora sobre la multiplicación del crecimiento viral</u>	29
3.2. <u>Acción inhibidora sobre el crecimiento de otros microorganismos</u>	30
3.3. <u>Acción inhibidora de la división celular</u>	30
3.4. <u>Acción sobre ciertas funciones celulares</u>	33
3.5. <u>Acción sobre la superficie celular</u>	34
3.6. <u>Interacción del interferón con el sistema inmunitario</u>	34
3.7. <u>Semejanza del interferón con el sistema hormonal</u>	35

II. VARIACIONES EN LA SINTESIS DE INTERFERON.	37
III. LA SUPERINDUCCION DE INTERFERON	45
1. <u>Aspectos bioquímicos de la superinducción de interferón</u>	47
2. <u>Aplicaciones clínicas de la superinducción</u>	52
IV. MECANISMOS DE RESPUESTA ANTIVIRAL DEL HUESPED.	54
1. <u>Sobre la inmunorespuesta antiviral.</u>	54
1.1. <u>Los virus como antígeno.</u>	56
1.2. <u>La respuesta inmune.</u>	72
1.3. <u>Depresión o supresión de la respuesta inmune</u>	80
2. <u>Relaciones entre interferón y respuesta inmunitaria.</u>	83
2.1. <u>Células productoras de interferón inmune.</u>	84
2.2. <u>Efecto del interferón sobre el sistema inmunitario "in vitro" e "in vivo"</u>	87
2.3. <u>Papel del interferón tipo II en la inmunorespuesta.</u>	94
2.4. <u>Intervención de los inductores de interferón en la interacción, interferón-células inmunocompetentes.</u>	95
2.4.1. <u>Los inductores de interferón.</u>	96
2.4.2. <u>La tilorona como inductor de interferón</u>	97
2.4.3. <u>La ciclofosfamida como sustancia inmunosupresora</u>	101
2.5. <u>Hipótesis sobre la acción inmunosupresora del interferón</u>	103

V. ESTADO ACTUAL DEL TEMA	107
-------------------------------------	-----

PARTE EXPERIMENTAL

I. PROTOCOLO	115
II. MATERIAL Y MEDIOS	118
1. <u>Virus</u>	118
2. <u>Células huésped</u>	119
3. <u>Animales de experimentación</u>	120
4. <u>Endotoxinas</u>	120
5. <u>Medios para cultivo de células</u>	121
6. <u>Soluciones varias y tampones</u>	123
III. TECNICAS	125
1. <u>Obtención de las suspensiones infectivas virales</u> 125	
2. <u>Inactivación de los virus</u>	128
2.1. <u>Termo-inactivación viral</u>	128
2.2. <u>Inactivación viral por betapropiolactona</u> . . 129	
3. <u>Titulación de la infectividad viral</u>	130
3.1. <u>Valoración por efectos citopáticos</u>	132
3.2. <u>Valoración mediante placas infectivas</u> . . . 133	
3.3. <u>Estudio de la termosensibilidad de los virus con respecto a su poder infectivo y hemaglutinante</u>	134
4. <u>Preparación de los cultivos celulares</u>	136

4.1. <u>Fibroblastos de embrión de pollo</u>	136
4.2. <u>Esplenocitos</u>	137
4.3. <u>Células L.</u>	138
5. <u>Obtención de eritrocitos.</u>	139
5.1. <u>Eritrocitos de pollo</u>	139
5.2. <u>Eritrocitos de carnero</u>	140
6. <u>Prueba de hemaglutinación.</u>	141
7. <u>Células formadoras de anticuerpos IgM.</u>	142
7.1. <u>Inmunización de animales frente a SRBC.</u>	142
7.2. <u>Técnicas de Jerne.</u>	143
8. <u>Inducción de interferón</u>	145
8.1. <u>En pollos y en ratones con virus y lipopolisacáridos.</u>	146
8.2. <u>Sobre fibroblastos de embrión de pollo</u>	148
8.3. <u>Sobre células L</u>	150
8.4. <u>Sobre esplenocitos de ratón y pollo</u>	150
8.5. <u>"in vitro" sobre esplenocitos estimulados por infección viral.</u>	151
8.6. <u>Sobre pollos y ratones con tilorona.</u>	152
9. <u>Titulaciones de interferón.</u>	153
9.1. <u>Preparación de piezas de membrana corioalantoidea.</u>	153
9.2. <u>Titulación del interferón presente en sueros de pollo sobre MCA.</u>	154
9.3. <u>Titulación del interferón en cultivos celulares.</u>	156

v.

10. <u>Titulación de complemento.</u>	157
11. <u>Estimulación de esplenocitos sensibilizados.</u>	159
12. <u>Tratamiento de pollos y ratones con interfe- rón exógeno.</u>	161
13. <u>Tratamiento "in vitro" de esplenocitos aviares y murinos con interferón</u>	162
IV. RESULTADOS	164
1. <u>Estudios previos de los sistemas biológicos de ensayo</u>	164
1.1. <u>Viabilidad y supervivencia de fibroblas- tos de pollo</u>	164
1.2. <u>Viabilidad y supervivencia de células L</u>	167
1.3. <u>Vitalidad de la membrana corioalantoidea.</u>	168
1.4. <u>Actividad biológica del NDV, FPV, influen- za y Sendai en fibroblastos</u>	169
1.5. <u>Termosensibilidad viral</u>	169
2. <u>Inducción de interferón en pollo</u>	175
2.1. <u>Inducción en condiciones normales</u>	175
2.2. <u>Inducción en células sensibilizadas</u>	188
2.2.1. <u>Pruebas de neutralización cruzada entre NDV y FPV en células sensi- bilizadas</u>	195
3. <u>Inducción de interferón en ratón.</u>	196
3.1. <u>Inducción en condiciones normales</u>	196
3.2. <u>Inducción previa sensibilización por NDV y FPV</u>	199

4. <u>Acción del interferón "in vivo" sobre la respuesta inmune en pollo y ratón.</u>	204
5. <u>Acción del interferón "in vitro" sobre la respuesta inmune en pollo y ratón</u>	225
5.1. <u>Acción sobre las células formadoras de IgM.</u>	226
5.2. <u>Acción sobre la activación policlonal de los esplenocitos</u>	229
6. <u>Inducción de interferón con tilorona en pollo y ratón y su influencia en la inmunorrespuesta</u>	233
6.1. <u>Respuesta en niveles de interferón circulante y sobre células formadoras de IgM.</u>	233
6.2. <u>Variaciones de respuesta en la activación policlonal de linfocitos.</u>	241
7. <u>Estudio comparativo del efecto de la ciclofosfamida sobre la inducción de interferón e inmunorrespuesta en pollos.</u>	244
7.1. <u>Ensayos previos con los agentes virales y ciclofosfamida.</u>	244
7.2. <u>Respuesta de interferón e inmunitaria en pollos en presencia de ciclofosfamida.</u>	252
V. <u>CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS</u>	265
1. <u>Acerca de la idoneidad de los sistemas de ensayo</u>	265
2. <u>Variaciones en la inducción de interferón en pollos.</u>	268
3. <u>Efecto de una virus-sensibilización previa en la inducción de interferón</u>	270
4. <u>Efecto del interferón exógeno "in vivo" e "in vitro" sobre la respuesta inmunitaria del huésped.</u>	275

4.1. <u>Los efectos "in vivo".</u>	275
4.2. <u>Los efectos "in vitro"</u>	279
5. <u>Efecto de un inductor sintético de interferón</u>	282
6. <u>Efecto de un inmunosupresor</u>	286
7. <u>Variaciones en función de las características del sistema inmunitario del huésped.</u>	293
VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES	297
VII. BIBLIOGRAFIA	305

ABREVIATURAS

AVG: gene antiviral; BPL: Beta propiolactona; Con A: Concanavalina A; CY: Ciclofosfamida; DEAE-dextrano: Dietil amino-etil-dextrano; DICT: Dosis infectivas para cultivo de tejidos; DL: Dosis letales; DLE: Dosis letales para embrión de pollo; DMSO: Dimetil sulfoxido; EEE: Virus encefalítico equino Este; FLU: Virus influenza; FPV: Virus de la peste aviar; LPS: Lipopolisacárido; MCA: Membrana corialantoidea; M.e.: mercaptoetanol; MEM: Medio esencial mínimo; MFC: Medio de crecimiento para fibroblastos; MFM: Medio de mantenimiento para fibroblastos; NDV: Virus de la pseudopeste aviar; PBS: Solución tampón fosfato; PFC: Células formadoras de placas (hemolíticas); PHA: Fitohemaglutinina; Poli I:C: Ácido poliribonucleosínico-ácido poliribocitídico; SDS: Dodecilsulfato sódico; SEA: Endotoxina A estafilocócica; SFB: Suero fetal bovino; SRBC: Eritrocitos de carnero; TIP: Proteína inhibidora de la traducción; UFP: Unidades formadoras de placas (infectivas); UFPH: Unidades formadoras de placas hemolíticas; UI: Unidades interferón; VSV: Virus de la estomatitis vesicular.

INTRODUCCION

Si consideramos la atención prestada por los investigadores a la problemática del conocimiento del interferón, veremos que -desde su descubrimiento en 1956- las publicaciones aparecidas, en función del tiempo y del interés particularmente demostrado, parecen concentrarse en tres acontecimientos fundamentales que representan como tres hitos de esperanza en el afán del hombre por luchar contra la infección viral. Estos tres eventos parecen ser: su descubrimiento, las posibilidades de superinducción y su intervención como modulador -aún incontrolado- de la respuesta inmune.

Desde nuestro punto de vista es quizá, esta última, la más importante por cuanto -si acudimos a una visión de campo unitario en Biología- entraña una serie de interrelaciones entre muy distintas respuestas del huésped que conllevan tanto a fenómenos de rechazo en transplantes como a alteraciones en desarrollos tumorales o a una defensa frente a las infecciones; y considerando el problema desde una vertiente relativa al huésped creemos que el fenómeno ha sido mucho menos estudiado en aves que en mamíferos. De aquí que, a la hora de presentar nuestra Memoria de Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas, hayamos pensado en el interés que supone aportar nuevos datos para el mejor conocimiento de la problemática de inducción

de interferón en pollos, haciendo a la vez un estudio comparativo sobre ratones en idénticos procesos experimentales. Suponemos que esto nos permitirá obtener una visión mas realista de las diferencias marcadas por la Evolución no sólo en cuanto a la variabilidad natural de estos animales sino también - y esto es mas definitivo- en cuanto a que comparamos dos sistemas inmunitarios perfectamente desarrollados pero completamente distintos en lo que se refiere a su diferenciación a nivel del sistema bursal. Si estos datos pueden aportar algo al conocimiento fundamental de los mecanismos biológicos de defensa del huésped o facilitar la tarea a otros investigadores en este campo, nos sentiremos plena e íntimamente recompensados de las muchas horas y dificultades pasadas en el laboratorio.

PARTE BIBLIOGRAFICA

I. SIGNIFICACION BIOLOGICA DE LOS INTERFERONES

El interferón fue descrito en 1957 por ISAACS y LINDENMANN quienes observaron que líquidos procedentes de cultivos celulares infectados por virus contenían una proteína capaz de reaccionar con células normales y hacerlas resistentes a posteriores infecciones producidas por una amplia variedad de agentes virales (ISAACS, 1963). Actualmente los trabajos que existen sobre interferón son muy numerosos y, en algunos casos son contradictorios, por lo que resulta difícil sintetizar los datos al respecto.

Desde el punto de vista de la relación virus, es decir la interacción -célula huésped-parásito-, lo que más llama la atención son los fenómenos de producción y actuación de los interferones. El sistema interferón, como defensa contra los virus, no funciona en ausencia de una infección viral. Cuando este sistema es activado por la infección, aparecen dos mecanismos de defensa importantes: la inducción o producción de interferón y el subsiguiente desarrollo de su actividad antiviral a expensas de la producción de una proteína antiviral.

1.- Sobre la síntesis de interferón

El interferón puede ser sintetizado por todas las células nucleadas del cuerpo cuando estas son infectadas por virus; sin embargo, DE MAEYER y cols. (1969) comprobaron que los linfocitos eran la fuente primaria de interferón inducido por mixovirus. Por otra parte, ciertos grupos de virus producen mas cantidad de interferón que otros, como sucede con arbovirus y mixovirus en relación con enterovirus.

La naturaleza del inductor de interferón es muy variada, ya que se ha comprobado que existen muy distintas posibilidades biológicas de producción de interferón; desde los inductores de naturaleza viral, ya mencionados, moléculas de RNA y DNA bicatenarias e incluso algunas veces RNA monocatenario, hasta sustancias mitogénicas para linfocitos B y T.

Una idea de los distintos tipos de inductores nos la proporcionan HO y ARMSTRONG (1975) pudiendo clasificarlos como inductores:

TIPO 1. A (polinucleótidos)

1. Virus animales DNA y RNA
2. Virus de plantas e insectos
3. Micofagos y bacteriófagos
4. RNA celular de doble cadena
5. RNA sintético de doble cadena
6. DNA y RNA monocatenarios

TIPO 1. B Otros antígenos

1. Bacterias fagocitadas por macrófagos y microorganismos,

5.

- intracelulares (clamidia, toxoplasma, micoplasma, etc).
- 2. Productos bacterianos (polisacáridos, LPS, etc)
- 3. Polímeros (pirano, ácido poliacrílico, polisulfatos, etc)
- 4. Sustancias de bajo peso molecular (tilorona, colorantes básicos, propanodiamina, aminothiols, etc).

TIPO II. Mitógenos de linfocitos

- 1. Fitohemaglutinina
- 2. Concanavalina A
- 3. Mitógeno Poreweed

1.1. Virus activos e inactivados como inductores de interferón

Tanto los virus activos como inactivados pueden inducir la síntesis de interferón con una eficiencia relativa que depende del tipo de virus empleado y del sistema productor de interferón. Así, en 1957 ISAACS y cols. observaron que un tipo de virus influenza, tenía mayor capacidad inductora de interferón cuando era inactivado por medio de luz U.V. respecto al mismo virus mantenido en estufa a 56° C. Posteriormente BURKE e ISAACS (1958 b) comprobaron que el virus influenza irradiado con luz U.V. durante 30 segundos se convertía en un inductor de interferón mucho más efectivo, mientras que una irradiación más prolongada resultaba perjudicial.

Por otra parte, HO y BREINING (1962) demostraron que cuando un cultivo de células estaba pretratado con virus Sindbis inactivado, y eran posteriormente infectadas con el mismo virus en estado activo, tenía lugar una mayor producción de interferón en el medio de cultivo celular. Los mismos autores,

tres años mas tarde, (HO y BREINING, 1965) observaron que utilizando NDV irradiado inadecuada y excesivamente no tenía capacidad para inducir interferón en cultivos celulares de embrión de pollo. También MAHDY y HO (1964) trabajando con el virus EEE inactivado por luz U.V. y mantenido a 37° C, observaron que la producción de interferón resultaba aumentada en cultivos de células de pollo posteriormente infectadas con virus Sindbis.

En 1970 GANDHI y BURKE encontraron que FPV infectivo y NDV no eran capaces de inducir síntesis de interferón en cultivos de células de pollo porque actuaban inhibiendo la síntesis de proteínas de la célula huésped. Cuando se destruía este efecto inhibidor, por irradiación U.V. o por la acción de hidroxilamina, tenía lugar la formación de interferón, sin embargo, una inactivación excesiva podía destruir la beligerancia del ácido nucleico viral para la formación de interferón.

Por último, existen otros virus que no inducen interferón tras su inactivación; así HO y ENDERS (1959) encontraron que el poliovirus PMC tipo II inducía interferón en células amnióticas humanas cuando era infectivo pero no inactivado. También los arbovirus, que son usualmente muy buenos inductores de interferón cuando están en estado infectivo, resultan generalmente ineficaces para la inducción cuando están inactivados (HENDERSON y TAYLOR, 1961; HO y BREINING, 1962; LOCKART, 1963; VILCEK, 1963). Se ha observado, sin embargo, que una inactivación lenta a 35 ó 37° C podía mantener la capacidad inductora de interferón de ciertos virus, como por ejemplo Chikungunya (GIFFORD y HELLER, 1963), EEE y Sindbis (LECLERC y COGNIAUX-LECLERC, 1965). etc. aunque si tal inactivación se realizaba a 56° C se alcanzaba la destrucción de la capacidad inductora, sobre todo en el caso de los dos últimos virus citados.

1.2.- Mecanismo de inducción de interferón

Todos los datos recogidos en la bibliografía apuntan a que el mecanismo inductor de interferón es siempre el mismo, cualquiera que sea la molécula inductora empleada, y que es necesaria la duplicación de la cadena viral cuando se trate de virus monocatenarios tanto si es RNA como DNA.

Los primeros trabajos sugerían que el interferón podría aparecer como consecuencia de una síntesis o liberación de un pre-interferón; sin embargo, estudios posteriores aclararon que tenía lugar la síntesis de una sustancia nueva. La información para la inducción del interferón, identificada como una glicoproteína (DORNER y cols. 1973), ha sido asociada a los genes de una manera muy precoz en la evolución filogenética de las especies, pues el mecanismo interferón se encuentra a niveles muy inferiores en la escala evolutiva biológica. En la Fig. 1 queda representado este mecanismo en dos partes: una fase de formación de interferón y otra fase de acción del interferón.

En el estado actual de conocimientos sobre el tema se puede presentar el siguiente esquema de regulación de interferón (Fig. 2) y cabe resumir la síntesis de interferón, a la vista de las figuras anteriores diciendo:

i) El virus penetra en la célula pierde su cubierta y libera su ácido nucléico mono o bicatenario.

ii) Tiene lugar una replicación del ácido nucléico viral ligándose una cadena a los ribosomas de la célula (FALCOFF y FALCOFF, 1970). Este acontecimiento, hipotéticamente, puede servir como señal de disparo para la derrepresión de un cistrón DNA de la

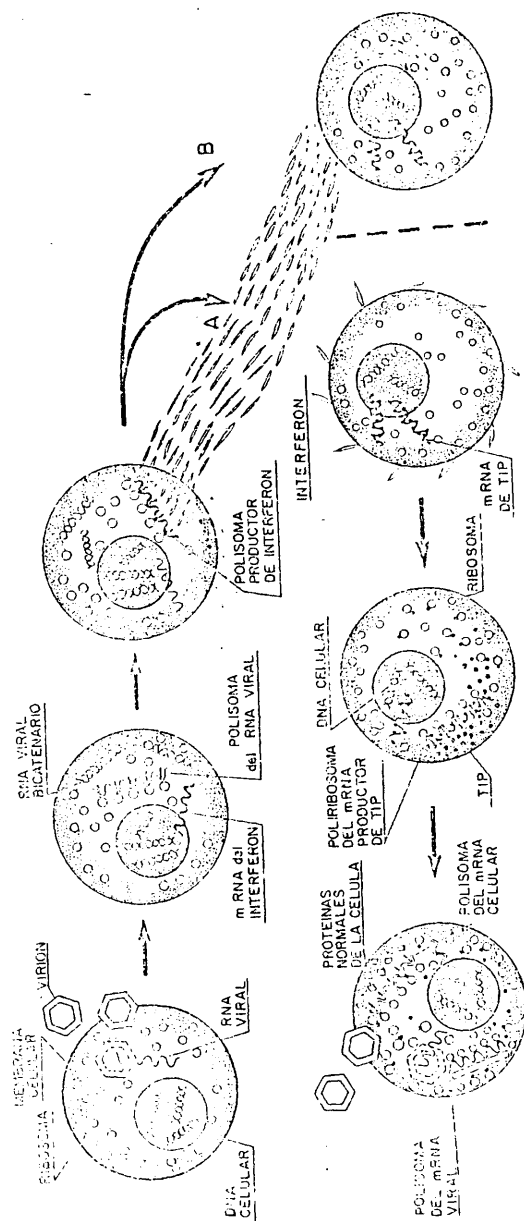


Fig. 1.- Mecanismos de inducción y acción del interferón

ESQUEMA DE REGULACION

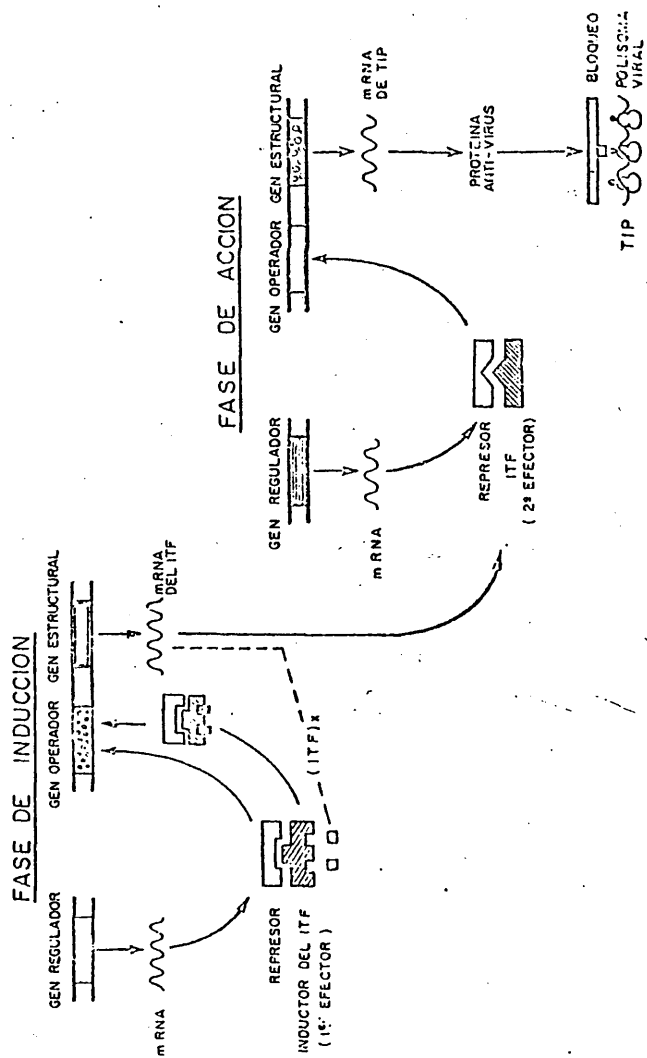


Fig. 2.- Esquema de regulación del interferón

célula huésped, formándose a continuación el m-RNA del interferón.

iii) Los polisomas que tienen incorporado el m-RNA del interferón producen y liberan interferón que va a actuar en otras células cuando se libere de la célula productora; en ese momento podemos decir que nos encontramos con el fenómeno de especificidad de especie celular, por lo que debe existir una fase que esté a nivel de la fijación (por medio de receptores celulares específicos) o durante la penetración a través de la membrana celular.

Trabajos recientes han tenido como objetivo la localización de los cromosomas en los que reside la puesta en marcha de la inducción de interferón. Los datos más interesantes y concluyentes son los reunidos en los trabajos de TAN y cols (1974) y CREAGAN y cols (1975) sobre la producción de interferón humano o murino en células híbridas de hombre y ratón. Utilizando 40 tipos de células híbridas entre clones y subclones, obtenidos en su mayor parte por mezcla de leucocitos humanos con células de línea de ratón, o bien con fibroblastos de piel humana, leucocitos humanos, fibroblastos de pulmón humanos, células L y también fibroblastos humanos y células de línea de ratón, observaron que:

i) los cromosomas humanos 2 y 5 estaban siempre presentes en aquellos cultivos que habían producido interferón en sus condiciones experimentales, viendo que el cromosoma 2, y particularmente el 5, presentaban un alto grado de concordancia con la aparición de interferón humano en relación con los otros cromosomas; y también

ii) que tan sólo los clones que poseían los cromosomas 2 y 5 producían interferón humano.

A continuación aparece un resumen de la correlación entre estos cromosomas y la aparición de interferón humano

1.3. Mecanismo de acción

En la Figura 1 hemos visto los dos pasos posibles planteados en cuanto a la acción del interferón. La teoría mantenida hasta hace pocos años (BURKE e ISAACS, 1958 a y b; ANDREWS, 1961; ISAACS y cols. 1961) (B) apoya la idea de la entrada del interferón en la célula. Trabajos posteriores (ANKEL y cols. 1973; CHANY y cols. 1975) sostienen una segunda posibilidad (A), en la cual el interferón no entra en la célula sino que establece una unión con receptores específicos de membrana, de naturaleza proteica, y que soportan moléculas gangliosídicas con gran afinidad por el interferón.

CHANY y cols. comprobaron esta afinidad mediante experimentos de adsorción de interferón a partículas de CNBr - Sepharosa: añadieron la mezcla a cultivos celulares dentro de un anillo de plástico que impedía el paso de aquellas partículas al resto del cultivo; transcurridas 24 horas retiraban el anillo e infectaron el cultivo con VSV. Así se observaron las placas o marcas infectivas viendo que la porción de cultivo que estuvo enmarcada dentro del anillo no presentaba dichas placas, mientras que estas eran patentes en el resto del cultivo. También comprobaron que se podían hacer tratamientos sucesivos de cultivos celulares por este sistema de partículas, sin llegar a agotar el poder protector del interferón ligado; esto parece

CUADRO . I

CORRELACION DE LA INDUCCION DE INTERFERON
HUMANO CON LOS CROMOSOMAS 2 Y 5. _____

<u>Cromosomas humanos</u>		<u>Interferón inducido por NDV. Nº de hígidos estudiados.</u>	
		<u>+</u>	<u>-</u>
2 +	5 +	10	0
2 +	5 -	0	9
2 -	5 +	0	2
2 -	5 -	0	19

indicar claramente que sólo es necesario un contacto del interferón sobre la pared celular para producir la respuesta (SHEAFF y STEWART, 1969).

Las moléculas gangliosídicas citadas anteriormente, que tienen gran afinidad por las glicoproteínas, poseen un mecanismo de puesta en marcha para las reacciones que sucesivamente se han de ir desarrollando hasta la síntesis total del interferón.

Sea cual fuere el destino del interferón, entrada en la célula o unión a receptores de membrana, la aparición del estado virus-resistente requiere la síntesis de RNA y proteína como se ve en el esquema de regulación de la Fig. 2, según EPSSTEIN y EPSTEIN (1976) la señal de formación de proteína se transmite al genoma celular por medio de histonas u otros péptidos; en células humanas esta señal parece ser recibida en el cromosoma 21.

El estudio del cromosoma 21 ha sido de interés particular a causa de su papel en la etiología del síndrome de Down (trisomía 21). Estos estudios aclararon la existencia de 3 genes en este cromosoma, uno de ellos, de gran importancia dentro de este tema es el gen antiviral AVG. La primera demostración sobre la localización del gen AVG (TAN y cols. 1973) está basada en las observaciones sobre células híbridas murinas humanas; estas células respondían al efecto antiviral de interferón exógeno humano, tan sólo si el cromosoma 21 humano estaba presente, y la respuesta era nula cuando tal cromosoma no formaba parte del híbrido.

Conocida la localización del AVG sobre el cromosoma 21 parecía razonable que existieran diferencias funcionales en la respuesta al interferón entre las células, dependiendo del número de cromosomas 21 que tuvieran; en efecto, tales diferencias fueron encontradas por TAN y cols (1973); DE CLERCQ y cols. (1975) CHANY y cols (1975). Estos autores observaron que después de un tratamiento, con interferón exógeno, los fibroblastos procedentes de individuos trisómicos para el cromosoma 21, eran más resistentes a la infección viral que lo fueron las células procedentes de individuos normales, mientras que las células monosómicas para tal cromosoma eran las que presentaban menos resistencia a la infección.

Los dos tipos de interferón proporcionaron una respuesta media que era en las líneas celulares trisómicas tres veces mayor que la de las células normales, mientras que en la línea monosómica, era la mitad o menos respecto a las normales.

En esta misma línea de estudio se arrojó nueva luz sobre el tema demostrando, que una línea trisómica sólo para la mitad distal del brazo largo del cromosoma 21, tenía mayor sensibilidad a los interferones mencionados que la línea celular normal, hecho que indicaba la localización exacta del gen AVG sobre el cromosoma 21.

Como se ha señalado anteriormente el interferón desencadena una serie de acontecimientos que van a actuar sobre el genoma celular dando lugar a la aparición de un nuevo RNA, el m-RNA de la proteína inhibidora de la traducción (Translation Inhibitory Protein, TIP). Este TIP fue aislado por SAMUEL y JOKLIK (1974) a partir de células tratadas con interferón y se identificó como un polipéptido de Pm 48.000 daltons que aparece siempre en las células tratadas, pero nunca en las no tratadas.

Este polipéptido puede inhibir la traducción del mRNA viral en un 90% (SAMUEL y JOKLIK, 1974) sin que presente efecto alguno sobre la traducción del mRNA de la célula ni sobre cualquier otro mRNA exógeno, extraño o sintético (WIEBE y JOKLIK, 1975). Hasta el momento no ha podido ser identificado el elemento que desencadena la producción del TIP.

Muy recientemente KNIGHT y KORANT (1979) han observado que tratando fibroblastos diploides humanos con interferón procedente de fibroblastos, durante 8 horas, quedaba inhibida la replicación del VSV. Comparando la proteína total de las células tratadas con el interferón durante las 8 horas, con la que existía en las células no tratadas encontraron que las células sometidas a la acción del interferón contenían 4 proteínas que no estaban en las células testigo. Añadiendo actinomicina D a las células conjuntamente con la adición del IF quedó inhibida la síntesis de las 4 proteínas. Los autores citados llegaron a la conclusión de que estas proteínas eran inducidas por el IF y que estaban relacionadas con la inhibición de la replicación viral.

En cuanto a otros aspectos moleculares de la acción del interferón, se ha comprobado que el efecto protector del interferón es bloqueado por sustancias que inhiben la formación del RNA y proteína. De acuerdo con esto, la hipótesis es que el interferón induce la síntesis de una segunda y altamente específica proteína antiviral que actúa secuencialmente así:

i) El interferón se fija a una célula y derreprime un cistrón del DNA del huesped formando un RNA mensajero de proteína inhibidora de la traducción.

ii) Una vez formado el TIP - mRNA este se une a los ribosomas dirigiendo la síntesis de la proteína inhibidora de la traducción (TIP) y aportando estas moléculas al conjunto ribosomal del citoplasma.

iii) Cuando el virus penetra en la célula, el TIP asociado con los ribosomas celulares, evita la unión de éstos últimos al RNA viral bloqueando así la capacidad de replicación del virus, pero el mRNA celular continua siendo traducido para formar las proteínas normales.

Como resumen de cuanto llevamos expuesto consideramos oportuno sintetizar el proceso de inducción y de acción en los siguientes 7 pasos ligados entre sí (Fig. 3).

1.4. Síntesis y aparición de interferón "in vivo" e "in vitro"

Se ha estudiado la inducción de interferón en cultivos celulares, órganos y suero de animales bajo condiciones muy diversas. Así, ya en 1958, NAGANO y KOJIMA encontraron inhibidores antivirales tipo interferón en la piel y testículos de conejos infectados localmente con virus vacunal. También BARON y BUCKLER (1963) atrajeron el interés hacia el uso de animales para estudios sobre producción de interferón y llegaron al descubrimiento de que muchas sustancias de naturaleza no viral podían también inducir interferón en animales, aunque a menudo no ocurría así en los cultivos celulares que estudiaron. Algo mas tarde YOUNGNER y STINEBRING en 1964 encontraron interferón en los sueros

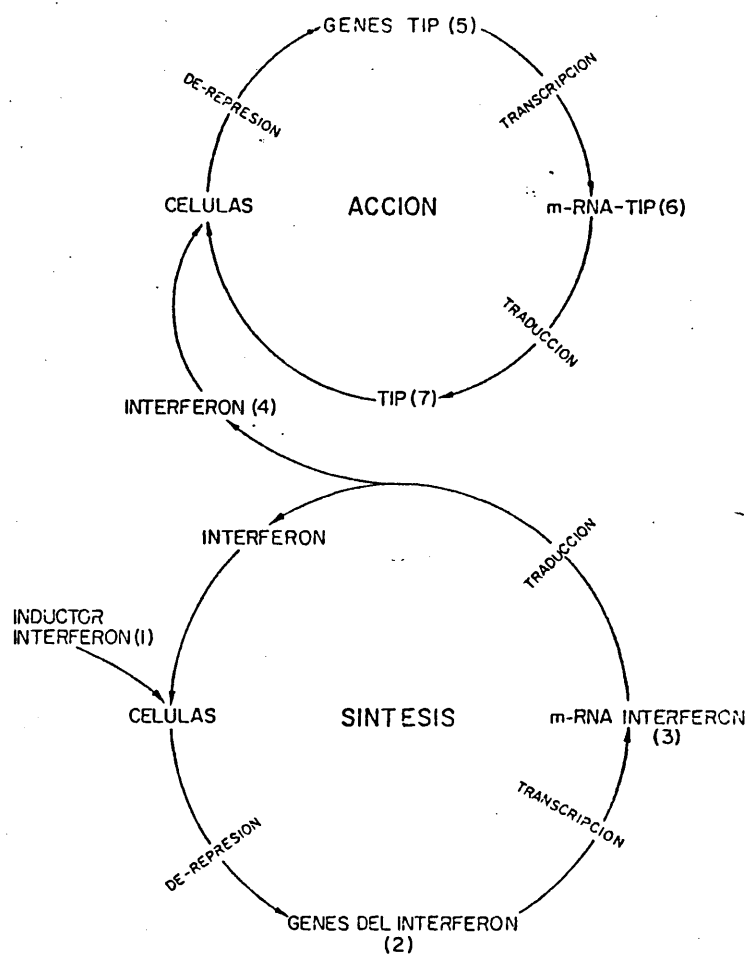


Fig. 3.- Esquema sintetizado del proceso de inducción y acción de los interferones

de pollos que habían sido inoculados intravenosamente con una gran dosis de Brucella abortus, comprobando claramente por primera vez la naturaleza no viral de un grupo muy amplio de inductores de interferón. Los resultados fueron confirmados posteriormente por DE SOMER y cols (1969), quienes inyectaron B. abortus ($10^9 - 10^{10}$ organismos) intravenosa o intraperitonealmente en ratones y encontrando una máxima concentración de interferón en bazo y suero de estos animales 8 horas después de esta administración. Este tipo de interferón se encontró también en sangre, suero, secreciones nasofaríngeas, líquido cerebroespinal, etc. Con estas apariciones de interferón en las que no se señalaba ninguna infección viral, y dado que también aparecían interferones en infecciones con bacterias y otros parásitos, se tuvo la primera evidencia de los interferones inespecíficos.

La primera pregunta que nos planteamos en el estudio, de la aparición del interferón es en qué tejidos y qué células de tales tejidos son las responsables de la producción de interferón, lo que supone dos tipos de cuestiones:

i) ¿Qué células son intrínsecamente capaces de producir interferón ?

ii) ¿Qué tejidos forman interferón cuando se administra un inductor de interferón a un animal ?

Respecto a lo primero, se han llevado a cabo estudios sobre la capacidad de los cultivos primarios de distintos tejidos animales para producir interferón. Citando algunos de los más importantes hemos de decir que ya en 1961, SUTTON y TYRRELL, encontraron que cultivos de tiroides, amnios, riñón de embrión,

pulmón de embrión y fibroblastos humanos producían interferón cuando eran tratados con virus influenza tipo A, pero no recogieron datos sobre las cantidades obtenidas. Estas fueron posteriormente determinadas por GANDHI y STEWART (1968), en cultivos de células epiteliales o fibroblastos procedentes de pulmón, hígado, riñón, músculo cardíaco y esquelético de embrión de pollo. En todos estos casos utilizaron, como inductor de interferón, virus influenza inactivado por rayos ultravioleta. Así encontraron las mayores cantidades de interferón en cultivos epiteliales y de fibroblastos procedentes del tejido pulmonar; quizá la mayor afinidad del virus influenza por este órgano pudo haber influido en los resultados obtenidos.

Por otra parte, y teniendo en cuenta el tiempo de aparición del interferón, KONO y HO (1965) estudiaron qué células eran intrínsecamente buenas productoras de interferón preparando cultivos de bazo, hígado, riñón, cerebro y linfocitos de conejo. Todas las células fueron infectadas con virus Sindbis y se determinó el título de interferón presente en el medio en periodos de tiempo posteriores. Así encontraron interferón en los cultivos celulares de bazo e hígado 4 - 6 horas después de añadir el inductor, siendo la aparición algo posterior en los cultivos restantes. En este aspecto los cultivos de esplenocitos proporcionan cantidades grandes de interferón/célula y dado que el hígado y bazo poseen gran contenido de células retículoendoteliales, estos resultados parecen sugerir que estas células pueden producir interferón en mayor cantidad y en menor tiempo que otras (GLASGOW y HABEL, 1963).

En cuanto al segundo apartado que antes mencionamos, podemos citar también las experiencias de KONO y HO (1965) quienes inoculando intravenosamente a conejos una dosis grande de virus Sindbis estudiaron la cantidad de interferón producida en distintos órganos. Así encontraron gran cantidad de interferón en bazo y sangre, donde también aparecía virus, una pequeña cantidad del inhibidor antiviral en riñón y cerebro y ni virus ni interferón en distintos extractos de nódulos linfoides.

En cuanto a la *inducción de interferón en suero de animales*, BARON y BUCKLER (1963) encontraron que la inyección de dosis grandes de un virus no replicativo en el caudal sanguíneo daba lugar a grandes cantidades de interferón. En este tipo de inducción denominada "sistémica" o generalizada, el inductor de interferón interacciona con los tejidos formadores de interferón el sistema reticuloendotelial (S.R.E) sin replicación viral preliminar, produciendo en pocas horas gran cantidad de interferón. Por ejemplo, tras inyección intravenosa de NDV a conejos y ratones, tendrá lugar la aparición, en el suero de los mismos, de muchos miles de unidades interferón/ml en un periodo comprendido entre 4 - 8 horas después de la inducción. Los rendimientos máximos de interferón en suero (aproximadamente 8.000 unidades) fueron mejorados cuando se le inyectó virus formolizado por vía intravenosa, intraperitoneal o intramuscular, pero la duración de la actividad fué más prolongada cuando la inyección fue administrada intramuscularmente.

En cuanto al *inductor de interferón* óptimo se ha descrito que debe ser altamente activo, no infectivo, no tóxico y relativamente no antigénico (RODGERS y MERIGAN, 1972); ningún inductor válido cumple todos estos requisitos, de ahí, que los virus sean aún considerados como inductores potenciales por ex-

celencia para la aplicación clínica. En estudios sobre inducción de interferón en suero sanguíneo, utilizando el NDV como inductor y controlando los niveles a los 31 días después de la inducción, la cantidad de interferón fue alta o baja dependiendo del genotipo de las células donantes. Los genes pueden controlar directamente la producción de interferón pero posiblemente lo que hacen es regular factores secundarios que influyen en la inducción por NDV; así, por ejemplo, pueden regular la aparición a receptores virales en la membrana más que la producción de interferón.

En un estudio similar a los anteriores HO y KE (1970) inyectaron poli I:C a conejos por vía intravenosa; los mayores niveles de interferón aparecieron en pulmones, hígado y bazo y poco o nada en los demás órganos, existiendo la mayor concentración de interferón en el bazo. También VAN ROSSUM y DE SOMER (1966), inyectaron intravenosamente NDV a ratas y encontraron concentraciones 20 veces mayores en el bazo respecto a suero.

En definitiva, todos estos experimentos sugieren que las células reticuloendoteliales son fuente importante de interferón en animales cuando el inductor es de naturaleza viral y se administra por vía intravenosa. Es un hecho relevante que muchos inductores sean polímeros que tienen un alto Pm por lo que se dispersan difícilmente desde el lugar de la inyección subcutánea o intramuscular. De todos modos hay que tener en cuenta, sin embargo, que la afinidad de un virus por un órgano puede determinar el lugar de formación del interferón, independientemente de la vía de administración utilizada. Así FINTER (1965) inyectó intracerebralmente virus neurotrópico, West Nile, en ratones y encontró grandes cantidades de interferón en cerebro lo

que es confirmado por SUBRAHMANYAN y MINUS (1966) que además vieron que existe poco virus o interferón en cualquier otro órgano de estos ratones.

Los datos reunidos sobre el estudio de interferón en ratones nos ha proporcionado una valiosa información y es que las fuentes preferentes de trabajo en este campo son las células L (KAWADE, 1973; PAUCKER y cols. 1970) y las células L-243 (OIE- y cols. 1972) debido a su fácil crecimiento y niveles altos de producción de interferón. El inductor de interferón generalmente utilizado es el NDV que proporciona buenas cantidades del mismo en células de ratón, conejo, embrión de pollo y monos; sin embargo, precisa inactivación con rayos U.V. para que la cantidad de interferón en células de embrión de pollo sea considerada como buena (HO y BREINING, 1965); esta inactivación puede ser reemplazada ventajosamente haciendo termoinactivación.

La mayoría de los estudios efectuados sobre acción de interferón se han llevado a cabo en células de ratón y pollo debido a su rendimiento, utilizándose preparaciones parcialmente purificadas o no purificadas. En definitiva podemos mencionar una serie de factores que condicionan por si mismos la producción de interferón como son: naturaleza del inductor, vía de administración del inductor, fenotipo de una célula, edad del huésped, temperatura del cuerpo o temperatura de incubación, etc. Cuando un cultivo o animal ha producido interferón como respuesta a un inductor este resulta usualmente refractario o tolerante a dosis posteriores, presentando en el animal grados distintos de tolerancia cruzada.

En cuanto a la *aparición de interferón en el suero de animales* BARON y BUCKLER (1963) encontraron que la inyección de dosis altas de un virus no replicativo en el caudal sanguíneo daba lugar a grandes cantidades de interferón. En este tipo de inducción denominada sistémica o generalizada el inductor de interferón interacciona con los tejidos formadores de interferón del sistema retículo-endotelial sin replicación viral preliminar, produciendo en pocas horas grandes cantidades de interferón; así por ejemplo, tras inyección intravenosa de NDV a conejos y ratones, tendrá lugar la aparición, en el suero de los mismos, de muchos miles de unidades interferón por ml en un periodo comprendido entre 4 y 8 horas después de la inducción.

Los rendimientos máximos de interferón en suero (aproximadamente 8.000 unidades) fueron mejorados cuando se inyecta virus formolizado por vía intravenosa, intraperitoneal o intramuscular, aunque la duración de la actividad resulta mas prolongada cuando la inyección se administra intramuscularmente. En estudios sobre inducción de interferón en suero de animales por NDV, medido 31 días después de tal inducción, la cantidad fue alta o baja dependiendo del genotipo de las células productoras. Todo ello parece demostrar que los genes controlan directamente la producción de interferón y actividad de esta sustancia sin que hasta el momento se haya determinado en animales el gen o genes responsables de esta inducción y de la actividad del interferón tal como se ha efectuado ya en células humanas.

Dentro de estudios de este tipo se han encontrado niveles altos de interferón en suero de ratones 4 - 6 horas después de la administración de RNA de doble cadena (0,075 - 0,5 mg/Kg) por vía intraperitoneal o intravenosa (BUCK y cols., 1971; PLANTEROSSE y cols., 1970; SHARPE y cols., 1971). Así se

ha visto que los RNA naturales y el poli I:C son inductores muy eficientes en ratones, produciendo niveles de interferón mayores que los alcanzados con los inductores de moléculas de endotoxina u otros de bajo peso molecular (KLEINSCHMIDT, 1972). Dosis bajas de RNA de doble cadena producen niveles altos de interferón y protegen a ratones contra un amplio espectro de DNA y RNA virus. Los RNA mencionados estimulan también niveles de interferón altos en conejos siendo menos efectivo en ganado, monos, cerdo y hombres.

En otros estudios con distintos inductores se observaron niveles bajos de interferón en suero de ratones durante varios días después de haber recibido una inyección intravenosa de fitohemaglutinina (EPSTEIN y MERIGAN, 1968). También en ratones infectados con Mycobacterium tuberculosis (cepa BCG), se produjo interferón alcanzando un máximo a las 6 horas después de la administración intravenosa (SUGIYAMA y cols., 1972). Estudios posteriores han confirmado y difundido estos hechos (SALVIN y cols., 1973; SALVIN y cols., 1974; SALVIN y cols., 1975; WHEELLOCK, 1965). Asimismo, RONDA y cols. (1976) estudiaron y compararon el poder inductor de NDV y dos LPS, los procedentes de B. melitensis y P. aeruginosa, determinando el tiempo que transcurría desde la administración del inductor hasta la aparición del interferón, en cantidad máxima, en el suero de los animales. Los máximos niveles se obtuvieron en todos los casos a las 6 horas después de la inducción y el título máximo de interferón correspondió a aquel que había sido inducido por el NDV así como a la administración intravenosa del inductor citado.

2.- Propiedades químicas del interferón

Es un hecho ya conocido que los interferones son proteínas biológicamente activas, en concreto glicoproteínas; algunas de las cuales contienen una proporción elevada de carbohidratos y la mayoría de ellas exhiben carga y tamaño heterogéneos. Todas estas proteínas han sido estudiadas por medios biológicos indirectos, como por ejemplo, observando los cambios en la actividad antiviral que siguen a tratamientos físicos o químicos. En general, y para los interesados en el tema podemos señalar que las propiedades químicas de los interferones han sido revisadas últimamente por NG y VILCEK (1972), FANTES (1973) y WEIL y DORNER (1973).

Con la posible excepción de dos interferones, aislados por KNIGHT (1975, 1976), ninguno de los hasta ahora conocidos ha sido suficientemente purificado para poder realizar un análisis directo, debido a que son sustancias muy difíciles de obtener totalmente puras y conservando su actividad biológica.

WEIL y DORNER (1973) anteriormente citados, en su estudio sobre la estructura química de interferones lucharon contra la creencia en los resultados obtenidos por la acción de reactivos grupo-específicos, sin practicar ningún análisis subsecuente del residuo de aminoácidos o proteína alterada. Así se comprobó que los grupos sulfidrilos, si estaban presentes en los interferones examinados, no eran esenciales para la actividad antiviral. Por otra parte, también se ha comprobado que todos estos interferones estudiados son sensibles a los reactivos que rompen los enlaces disulfuro, por lo que estos grupos sí se les considera esenciales para la actividad biológica.

En cuanto a reactivos dirigidos contra grupos amino, que fueron usados con interferón de pollo (FANTES y O'NEILL, 1964), parecen no haber sido suficientemente específicos, y puesto que interferones de rata (SCHONNE, 1966) y conejos (KE y HO, 1968) no fueron inactivados por medios químicos similares, aún permanece en debate si la presencia del grupo amino es o no esencial para el efecto antiviral del interferón.

En relación con la naturaleza glicoproteica de los interferones, existen muchos resultados que aunque no totalmente concluyentes, sugieren la presencia de carbohidrato. Esto se piensa desde hace algún tiempo por resultados obtenidos mediante destrucción por periodato, solubilidad en algunos precipitantes de proteína, estabilidad al calor y heterogeneidad de carga. La primera evidencia clara de que un carbohidrato, el ácido siálico, formaba parte de un interferón fue proporcionado por SCHONNE y cols., 1970, quienes demostraron que la heterogeneidad del interferón de conejo aparecía enormemente reducida por tratamiento con neuraminidasa. DONER y WEIL, ya anteriormente citados, continuaron este estudio y proporcionaron la prueba definitiva de la existencia de otro carbohidrato su interferón además del ácido siálico.

En los últimos años se han hecho nuevos descubrimientos relacionados con la estructura química de los interferones. Estos resultados, obtenidos con interferón de conejo, ratón y humano no permiten generalizar sobre las características de un interferón ni establecer diferenciaciones claras entre unos y otros. Esperamos, que futuras investigaciones consigan aclarar muchas incógnitas en cuanto se refiere a las relaciones estructura-actividad de los interferones.

Uno de estos últimos descubrimientos se refiere a la protección de algunos interferones (por ejemplo de fibroblastos humanos y de ratón) contra la pérdida de actividad producida por calor, congelación - descongelación, desnaturalización de superficie y reducción por detergentes y también a su posible reactivación después de tal pérdida (MOGENSEN y CANTELL, 1974; STEWART y cols. 1974).

DAVEY y cols.(1976a) y SULKOWSKI y cols (1976) encontraron que los interferones poseían propiedades hidrofóbicas y que este grado de hidrofobicidad variaba enormemente de un interferón a otro, incluso dentro de la misma especie. Un uso extensivo de esta propiedad ha sido hecho con propósitos de purificación (DAVEY y cols., 1976; a y b; JANKOWSKI y cols. 1976; SULKOWSKI y cols. 1976).

De gran interés es una clase de interferón recientemente descubierta y que debe diferir en su estructura química de los interferones "clásicos": Son los llamados interferones tipo II producidos por la inducción inmune de leucocitos y de los que hablaremos más ampliamente en el capítulo referente a Inmunología. Estos interferones tipo II son mucho menos ácido estables que sus correspondientes interferones clásicos inducidos por virus. Difieren de ellos antigénicamente y algunos de ellos tienen propiedades biológicas y químicas semejantes a las descritas para el factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF). Los primeros interferones tipo II fueron descritos en ratón por YOUNGNER y SALVIN (1973) y luego en el hombre por VALLE y cols. (1974) y por EPSTEIN y cols. (1974).

Resumiendo y reuniendo en este punto todos los datos encontrados sobre la personalidad química del interferón podemos establecer una serie de propiedades principales que parecen comunes a todos los interferones animales:

- Son proteínas o glicoproteínas
- Se destruyen por enzimas proteolíticas, por agentes que reaccionan específicamente con ciertos aminoácidos y peryodato.
- No se destruyen por peptidasas, carbohidrasas y lipasas
- Su peso molecular puede estar comprendido entre 20.000 y más de 100.000 d. dentro de las mismas especies.
- No se sedimenta a 100.000 g | durante 2 horas
- Tienen un punto isoeléctrico comprendido entre pH 6,5 y pH 7,5
- Es estable normalmente entre pH 2 y pH 10
- También es estable a 37° C, frecuentemente a 56° C y aún a veces mas
- Son destruidos por la acción de la betapropiolactona (BPL), luz ultravioleta, e irradiación .
- Presentan amplio espectro antiviral pero con especificidad de la especie celular sobre la que se producen
- Inhiben la multiplicación viral a través de un efecto intracelular que implica una síntesis de RNA y proteínas dentro de la célula.

A la vista de estas propiedades cabe encontrar diferencias muy claras en los interferones producidos por un inductor según el tipo de células o bien, para los producidos por el mismo tipo de células, según el tipo de inductores. De ahí que sea posible referirse a "INTERFERONES" como término genérico cuando en cualquier publicación nos encontremos con el término interferón.

3.- Aspectos biológicos de la interacción virus-interferon- -huesped.

Desde que el interferón fuera descubierto por virólogos su estudio ha permanecido durante mucho tiempo como monopolio de los mismos en el campo de la Virología. En efecto, durante años se ha considerado que era exclusivamente una sustancia antiviral que no afectaba al metabolismo o función de la célula huesped (LEVY y cols. 1963; BARON y cols., 1966; LEVY y MERIGAN, 1966; MARCUS y SALB, 1966; FRIEDMAN y SONNABEND, 1970; SONNABEND y FRIEDMAN, 1973) pero estudios efectuados durante los últimos años han llevado a la conclusión de que los efectos antivirales del interferón no son si no una manifestación de su efecto sobre la célula al inducir alteraciones importantes en la fisiología celular, en función de su aumento o inhibición, según se resume a continuación.

i - Los fenómenos de inhibición pueden afectar a la multiplicación de virus animales, crecimiento intracelular de otros microorganismos, división celular y producción de anticuerpo y reacción de hipersensibilidad retardada.

ii - Su aumento interviene en la expresión de algunos antígenos en la superficie celular, citotoxicidad de linfocitos y fagocitosis

3.1.- Acción inhibidora sobre la multiplicación del crecimiento viral

Ya en 1963 ISAACS y LINDENMANN demostraron que el interferón ejercía un efecto antiviral cuando actuaba sobre la célula y no sobre el virus extracelular. De este modo

las células incubadas con interferón desarrollan una resistencia a los virus en grado proporcional a la concentración de interferón administrado y dependiendo de la temperatura de incubación; así por ejemplo, los interferones no actúan a 4° C (VILCEK y RADA, 1962). Una concentración dada de interferón generalmente ejerce su efecto máximo cuando se pone en incubación con las células a 37° C durante 5 - 8 horas (WAGNER, 1961; FINTER, 1964). Aquí consideramos imprescindible señalar que entre las propiedades del sistema interferón se encuentra su no especificidad en dos sentidos:

- a) diferentes estímulos virales inducen el mismo tipo de interferón.
- b) el interferón producido induce una resistencia celular contra una amplia variedad de virus y
- c) el interferón por el contrario, es enormemente específico para el tipo de células animal en la que ha sido inducido.

3.2.- Acción inhibidora sobre el crecimiento de otros microorganismos

Resulta de interés señalar que el interferón puede también inhibir otros agentes infecciosos distintos a los virus, como sucede por ejemplo con los miembros del grupo de agentes del tracoma-inclusión-conjuntivitis (TRIC) (SUELTFUSS y POLLARE 1963; HANNA y cols., 1966; REINICKE y cols. 1967) y protozoos del tipo Toxoplasma gondii (REMINGTON y MERIGAN, 1968).

3.3. Acción inhibidora de la división celular

Según datos relativamente recientes de algunos autores, el interferón es capaz de inhibir la multiplicación de células

tumorales y normales de distintas especies animales (GRESSER, 1977; STEWART y cols., 1976). Se ha comprobado que cuando se separa el interferón del medio nutriente y se lavan las células, el efecto inhibidor es reversible (GRESSER y cols., 1970; PAUCKER y cols. 1962) ya que tras un periodo de retraso variable las células tratadas pueden multiplicarse normalmente como sucede con los testigos sin tratar. Sobre una cierta variedad de sistemas experimentales, en ratón, se ha comprobado que el interferón ejerce una actividad antitumoral comparable a la de las sustancias quimioterápicas corrientemente empleadas (GRESSER, 1977; GRESSER, 1972; GRESSER y cols. 1976, STRANDER y cols. 1973 a y b; STRANDER y cols. 1977).

El interferón inhibe la regeneración del tejido hepático en ratones parcialmente hepatectomizados (FRAYSSINET y cols. 1973) y también la multiplicación de linfocitos alogénicos en ratones irradiados (CEROTTINI y cols, 1973), habiéndose comprobado asimismo que el interferón administrado a ratones lactantes es capaz de producir una marcada inhibición o retraso en su crecimiento y desarrollo (GRESSER y cols. 1975). La interpretación de este fenómeno difiere profundamente, ya que o bien los efectos inhibidores de los preparados de interferón sobre la multiplicación viral y la división celular son mediados por dos sustancias diferentes, o bien, ambos efectos son debidos a la misma molécula que nosotros llamamos interferón. Si se acepta la primera interpretación se debe estudiar el mecanismo del efecto antiviral del interferón y desechar los otros efectos como irrelevantes. Si por el contrario, se acepta la última interpretación, entonces se debe admitir que una célula tratada con interferón es realmente una célula alterada, ya que la multiplicación viral puede quedar inhibida totalmente y las células tratadas dejan de dividirse.

Se ha estudiado y comprobado que el interferón es la sustancia responsable de ambas actividades, por ejemplo:

- (a) células murinas y humanas, resistentes al efecto antiviral del interferón, han presentado resistencia al efecto del interferón sobre la división celular (GRESSER y cols. 1970; LINDHAL-MAGNUSSON y cols. 1971; GRESSER y cols. 1974; KATZ y cols. 1975).
- (b) preparaciones de interferón murino y humano, crudo y purificado, con independencia del tipo del tejido e inductor de interferón empleados (viral o no viral), inhibieron la multiplicación de células murinas y humanas (GRESSER y cols. 1970; PAUCKER y cols. 1962; KNIGHT, 1973; TAN, 1976; KUWATA y cols. 1976; FUSE y KUWATA, 1977; TOVEY y cols. 1975; KNIGHT, 1976; EINHORN y STRANDER, 1977), mientras que un interferón heterólogo (preparado con los mismos inductores), un interferón murino inactivado o un "falso" interferón resultaron totalmente inefectivos (GRESSER y cols. 1970).

Al comparar la actividad antiviral de diferentes interferones purificados con su acción inhibidora sobre la multiplicación celular se vió un claro paralelismo entre ambas actividades; y sus cinéticas de producción respectivas y las de pérdida de actividad por el calor resultan también paralelas (GRESSER y cols. 1973).

- (c) Cuando se calentaron preparaciones de interferón humano o murino en presencia de SDS y urea, en condiciones reductoras y no reductoras, y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida, apareció una correlación cuantita-

tiva directa entre la actividad antiviral de una fracción dada y su actividad inhibidora sobre la multiplicación celular (STEWART y cols. 1976).

3.4. Acción sobre ciertas funciones celulares

Pese a la capacidad de inhibir la división celular, el interferón puede actuar también aumentando ciertas funciones celulares especializadas: por ejemplo, incrementa la capacidad fagocitaria de los macrófagos hacia partículas de carbón (HUANG y cols. 1971; IMANISHI y cols. 1975); aumenta la citotoxicidad de linfocitos sensibilizados para células tumorales blanco (LINDAHL y cols. 1972); incrementa el número de células formadoras de anticuerpos (GISLER y cols. 1974) y el número de células Friend sintetizadoras de hemoglobina estimuladas por DMSO (LIEBERMAN y cols. 1974).

El tratamiento con interferón conduce al incremento en la producción de ciertas proteínas; así, incubando las células productoras con pequeñas cantidades de interferón tiene lugar un marcado incremento en la producción posterior de interferón cuando tales células se inoculan con inductores de interferón, viral o no viral, apropiados (ISAACS y BURKE, 1958; STEWART y cols. 1971). Este fenómeno, empleado en la superinducción de interferón, se conoce con el nombre de "cebado" o "priming".

El interferón, por otra parte, también puede aumentar la síntesis de prostaglandinas (YARON y cols. 1977) y la liberación de histaminas por linfocitos basófilos a través de IgE (IDA y cols. 1977), sin que se conozca aún el mecanismo de estos efectos (LINDAHL, 1974; GRESSER, 1975).

3.5. Acción sobre la superficie celular

Se ha demostrado que incubando células tumorales murinas (LINDAHL y cols. 1973; KILLANDER y cols. 1976) o células tumorales normales (LINDAHL, 1974) con cantidades relativamente pequeñas de interferón (por ejemplo 1000 unidades) durante 24 horas o más, tenía lugar un marcado incremento (de 4 a 16 veces) en la expresión de antígenos histocompatibles (H-2) de superficie. Asimismo se ha observado un efecto similar sobre timocitos y linfocitos de bazo recogidos de ratones recién destetados o adultos a los que se había administrado interferón o inductores del mismo (NDV, poli I:C y tilorona) (VIGNAUX y GRESSER, 1977; LINDAHL y cols. 1976).

Otras alteraciones producidas por el interferón sobre la membrana celular son: cambios de la morfología celular concomitantes con aquellas alteraciones (GRESSER, 1961); incremento en la carga negativa neta determinada por electroforesis celular (KNIGHT y KORANT, 1977); aumento de la posibilidad de unión de la concanavalina A radioactiva a la superficie celular (HUET y cols. 1974), disminución en el transporte de timidina (BROUTY BOYE y TOVEY, 1977); disminución de la capacidad para eliminar uridina marcada (DEGRE y HOVIG, 1976); incremento de los gránulos intramembranosos y alteración en la densidad de la membrana plasmática (CHANG y cols. 1977).

3.6. Interacción del interferón en el sistema inmunitario

Existe la evidencia de que los interferones juegan un importante papel en la regulación de la respuesta anticuerpo humoral, incluso en dosis que aparecen normalmente en el organismo después de una infección viral (BRAUN y LEVY, 1972; JOHNSON y BARON, 1976 a, b). Por otra parte, los interferones desempeñan una destacada actividad interviniendo en la modula-

ción de la inmunidad linfocitaria.

En la actualidad se considera que el interferón es el único componente biológico, que presenta un doble control sobre el sistema inmunitario celular, unas veces deprimiendolo y otras exaltandolo (BRAUN y LEVY, 1972; GISLER y cols. 1974; LINDAHL y cols. 1972).

En el capítulo posterior se estudiará con mas detalle la interacción de este sistema con el interferón.

3.7. Semejanza del interferón con el sistema hormonal

Recientes estudios indican que hay una analogía entre la estructura y función del receptor para el interferón y los receptores para las hormonas glicoproteicas y para las toxinas tetánica y colérica (LEE y cols, 1976; KOHN y cols, 1977 y MULLIN y cols. 1976). Esta relación ha permitido el uso de la tirotropina (TSH) y toxina colérica en la investigación sobre el mecanismo de acción del interferón (FRIEDMAN y KOHN, 1976; KOHN, 1977; GROLLMAN y cols. 1977). Los resultados obtenidos indican que la iniciación de la actividad antiviral del interferón es un acontecimiento que se produce a partir de la membrana celular.

Todo ello ha llevado a considerar que el interferón presenta una gran semejanza con las hormonas glicoproteicas basandose en los puntos siguientes:

- a) son compuestos glicoproteicos
- b) poseen un similar tamaño molecular
- c) ambos llevan a cabo una función transportadora de mensajes entre células

- d) como algunas de las hormonas peptídicas, el interferón parece interaccionar con receptores celulares localizados sobre la membrana celular y allí inducir la serie de pasos que conducen al estado antiviral. La interacción receptor-interferón es probablemente de tipo cooperativo, lo que significa que el interferón induce en el receptor cambios configuracionales que conducen a la activación (ANKEL y cols. 1973; CHANY, 1976).
- e) ausencia de consumo de interferón u hormonas glicoproteicas durante su acción sobre las células.
- f) derepresión genética y síntesis "de novo" de proteína(s) por las células que intervienen.

II. VARIACIONES EN LA SINTESIS DE INTERFERON

Como ya se ha indicado precedentemente la producción de interferón lleva consigo la derepresión de unos genes seguido de transcripción del mRNA y posterior traducción. Es lógico pensar que en tan complicado sistema molecular la presencia de ciertas sustancias químicas puede influir en la síntesis de interferón, tanto en cultivos celulares como en animales. De hecho los mecanismos del esquema de síntesis ha podido ser confirmado por los resultados obtenidos con ciertos inhibidores metabólicos como la actinomicina D, al actuar sobre la síntesis de RNA dependiente del DNA (REICH y cols. 1962); o con puromicina y cicloheximida, como inhibidores de la síntesis de proteínas. Así se puede comprobar que la formación de interferón "in vitro" inducida por virus es inhibida por la actinomicina D (HELLER, 1963; WAGNER, 1963; WAGNER y HUANG, 1965; LEVY y cols. 1965; HO y BREINING, 1965; WALTERS y cols. 1967). Esta producción queda también inhibida por dosis bajas de puromicina (WAGNER y HUANG, 1965; BUCHAN y BURKE, 1966) y cicloheximida (YOUNGNER y cols. 1965) que actúan a nivel post-transcripcional del mRNA del interferón. Estos dos últimos fármacos al actuar de formas diferentes producen distintos efectos; así la puromicina provoca una liberación prematura de la cadena polipeptídica en crecimiento (YARMOLINSKY y DE LA HABA, 1959) mientras que

la cicloheximida bloquea la traducción del mRNA (WILLEMS y PENMAN, 1966) aunque según se ha señalado por diversos autores (TAMAOKI y MUELLER, 1963; LONG y BURKE, 1970) ambos compuestos ejercen también un efecto inhibitor sobre la síntesis del RNA.

Por otro lado, en estudios "in vivo" HO y KONO (1965) tratando conejos con actinomicina D y estudiando su efecto sobre la producción de interferón por virus Sindbis, encontraron que la respuesta de interferón quedaba deprimida por la acción del antibiótico.

YOUNGNER y cols. (1965) y KE y cols. (1966) estudiando la cantidad de interferón inducida en ratones por el NDV y en conejos por el virus Sindbis, demostraron que la producción de interferón quedaba anulada cuando los animales eran tratados con dosis de puromicina que actúan como inhibidores de la síntesis de proteína en el hígado. Los autores, anteriormente citados, encontraron un comportamiento análogo con cicloheximida en ratones infectados con NDV

Sin embargo YOUNGNER y cols señalan, por otra parte, que las cantidades de interferón inducido por endotoxina o por virus en ratones, no era afectada por pretratamientos con una dosis de actinomicina, que es suficiente para reducir la síntesis de RNA en el hígado hasta un 3% con respecto al nivel normal; por otro lado cuando los ratones eran tratados con dosis de cicloheximida y puromicina que inhibían totalmente la síntesis de proteína en el hígado de los mismos, encontraron que la inyección de endotoxina producía una respuesta interferón aumentada y prolongada.

Hay que destacar que esta y otras sustancias en ciertas condiciones pueden aumentar los niveles de interferón, conociendo este fenómeno como superinducción como mas tarde veremos.

KE y cols.(1966) encontraron que la producción de interferón en conejos inyectados con endotoxinas no resultaba afectada cuando estos animales eran pretratados con una dosis de puromicina que inhibía totalmente la síntesis de proteína en el hígado. Los mismos resultados se obtuvieron "in vitro" con endotoxinas utilizando actinomicina D (KONO, 1967, FINKELSTEIN y cols.1968). Estos resultados sugirieron que en la inducción de interferón no estaban implicadas la síntesis de RNA dependiente del DNA ni de proteínas por lo que se mantuvo la tesis de que este interferón podría estar preformado en las células y ser liberado por la endotoxina.

Es preciso recordar que entre 1965 y 1970 los interferones estaban clasificados entre sintetizados "de novo" y preformados; esta última categoría englobaba los interferones cuya aparición no era sensible a la inhibición por drogas que suprimen la síntesis de RNA o proteína. Si tenemos en cuenta que ya YOUNGNER y cols. en 1965 apreciaron una elevación en el título de interferón en ratones, inducidos por endotoxinas y pretratados con cicloheximida y puromicina, podemos tener en consideración sus observaciones, que dieron lugar a varias publicaciones (VILCEK y NG, 1971; TAN y cols. 1971; MYERS y FRIEDMAN, 1971) y que demostraron que el interferón siempre era sintetizado "de novo", independientemente de la naturaleza del inductor; aportando, además, datos de aumento en la producción de

interferón "in vitro" e "in vivo" bajo la acción de drogas inhibidoras de RNA y proteínas, fenómeno que ha recibido el nombre de superinducción y que estudiaremos posteriormente con mayor detalle.

La relación en síntesis de interferón y presencia de antibióticos en el sistema biológico ha sido estudiada en nuestro Instituto en varias ocasiones (RONDA y ALONSO, 1974; RONDA y cols. 1976; BARASOAIN y cols. 1978) y con distintas moléculas ansamínicas. Se efectuó la inducción de interferón "in vitro" por NDV termoinactivado en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo en presencia de rifampicina (dosis de 100, 50, 10 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de medio de cultivo) y de rifamicina (dosis de 10 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de medio de cultivo) observando la influencia del factor intervalo de tiempos entre administración de droga e inductor de interferón. Añadiendo el antibiótico al cultivo cuatro horas antes, simultáneamente o cuatro horas después de la inoculación del NDV, también se pudo demostrar una acción inhibidora, variable para la rifampicina, que depende de la concentración estudiada y con efecto mayor cuando el antibiótico se añadía 4 horas antes respecto al inductor de interferón. La rifamicina resultó más inhibidora, a las dosis estudiadas, incluso cuando se añadía al cultivo celular simultánea o posteriormente al virus.

En estudios "in vivo" con pollos, utilizando NDV activo y los LPS anteriormente citados, se determinó la influencia de la rifampicina, rifamicina SV y AF/0-13 (un nuevo derivado de la rifamicina) inoculadas intravenosamente en dosis de 1 μg y 0,5 $\mu\text{g}/100$ gr peso vivo antes (1 y 2 horas), simultáneamente y después (2 y 4 horas) de la inducción.

Los títulos de interferón, que fueron determinados en el suero sanguíneo obtenido 4-6 horas después de la inducción, demostraron una máxima inhibición en la producción de interferón cuando los antibióticos fueron administrados previamente; en el caso de la rifamicina SV esta depresión se prolonga para los tratamientos simultáneos y posteriores. Estos antibióticos, que bloquean algunas RNA polimerasas dependientes del DNA en las células de mamíferos (WEHRLI y cols. 1968; JUHASZ y cols. 1972; SRB y cols. 1974), pueden también afectar por este mecanismo la producción de interferón, al igual que sucede con las respuestas inmunitarias humoral y celular (SUNG, 1974; PAUNESCU, 1970; DAJANI y cols. 1973; FLOERSHEIM, 1973); tampoco debe olvidarse el efecto inhibitor que estos antibióticos ejercen sobre las mitocondrias (GADALETA y cols. 1970) y que pueden afectar al mecanismo de algunas transformaciones bioquímicas que requieran energía.

En otro aspecto del problema, habremos de referirnos a ciertos inhibidores de interferón cuyo mecanismo está relacionado con la síntesis de ácidos nucleicos interfiriendo a nivel de bases púricas y pirimidínicas; entre ellas tenemos la 6-azauridina, inhibidor de la síntesis de RNA y 5-fluoro-uracilo que se incorpora al RNA celular produciendo alteraciones en la acción del interferón (NICHOL y TERSHAK, 1967); la azaticina (6-mercaptopurina) (FIELD y cols. 1967) que según ST. GEME y cols. (1969) no inhibe los efectos del interferón en células de pollo; 2-mercapto-1 (B-4-piridetil) bencimidazol (MPB), sustancia descrita por BUCKNALL y CARTER (1967) que inhibe la acción de interferón reversiblemente en células de pollo (FRIEDMAN y PASTAN, 1970). Esta molécula que no tiene efecto sobre la síntesis del RNA celular ni sobre la de la proteína (SKEHEL y

cols. 1967; NAKATA y BADER, 1969) parece actuar por medio de un bloqueo de los receptores del interferón en la membrana viral.

Por último, existen otros agentes capaces de influir en la acción antiviral del interferón. Como son el adenílico cíclico (AMPC), que según FRIEDMAN y PASTAN (1969) podía aumentar la respuesta interferón viral en cultivos de células de pollo a dosis 10^{-2} M. Se llegó a la conclusión de que el AMPC, tiene un efecto inhibitor sobre las funciones inmunológicas e inflamatorias de linfocitos (BOURNE y cols. 1974). Los resultados obtenidos indican que el AMPC juega un papel negativo en la producción de interferón por linfocitos y en la supresión de la respuesta productora de placas hemolíticas "in vitro" (JOHNSON, 1977).

Por otra lado también se ha visto que el AMPC inhibe la producción de interferón de tipo II en cultivos de esplenocitos de ratón C57BI/6 estimulados con mitógenos como Con A y enterotoxina estafilocócica A (SEA); y que el dibutiril-AMPC 2×10^{-4} M puede también inhibir la producción de interferón tipo II inducido por Con A y SEA entre el 85 y 96%, aunque se haya observado que tras la inducción de interferón en esplenocitos de ratón por Con A, y después de eliminar las células del sobrenadante, fue tratado con dibutiril-AMPC a la concentración reseñada sin que apareciera disminución del título del interferón lo que nos indica que su bloqueo sucede a nivel de inducción mas que de acción (JOHNSON, 1977).

También, la cortisona y otros esteroides pueden aumentar o inhibir la actividad del IF, dependiendo del sistema experimental en el que se estudia el efecto; por ejemplo, células de M.C.A. fueron mas sensibles a la infección viral después de

tratamiento con interferón y cortisona que cuando fueron tratadas con interferón solamente (KILBOURNE y cols. 1961; REINICKE, 1964).

Por otro lado, la hidrocortisona y la 17- α -metil-testosterona aumentaron el efecto antiviral del interferón en una línea de células tumorales de rata (DE MAEYER y DE MAEYER, 1963).

Cuando está presente suero fetal bovino, en concentraciones altas, en preparaciones de interferón se produce una disminución e incluso supresión de la actividad antiviral; pero sin embargo, en proporciones del 2 al 4% se utiliza como conservador de esta actividad (VILCEK y LOWY, 1967). Según parece, el inhibidor sérico puede ser eliminado por pase a través de columnas de Sephadex G 200 (ROSSMAN y VILCEK, 1968).

Finalmente, entre otros agentes capaces de intervenir en la síntesis de interferón, está la insulina que puede potenciar debilmente el efecto del interferón cuando se añade a células en concentraciones iguales o mayores a 10 μ g/ml y al mismo tiempo que el interferón (VILCEK y cols. 1967); sin embargo, cuando las células estaban sometidas a pretratamiento con insulina o suero, 18 horas antes de añadir el interferón, ambas ejercen un efecto inhibitor sobre la acción de éste (VILCEK y FRIEDMAN-KIEN, 1968).

Como ejemplo ilustrativo del diferente comportamiento de diversas drogas sobre la inducción de interferón tanto "in vitro" como "in vivo" presentamos el Cuadro II.

CUADRO II : COMPORTAMIENTO DIFERENCIAL EN LA INDUCCION DE INTERFERON EN PRESEN-

CIA DE ANTIBIOTICOS

INDUCTOR	INTERFERON INDUCIDO EN		TRATAMIENTO ANTIBIOTICO	TIEMPO DE APLICACION EN RELACION CON EL INDUCTOR	EFECTO
	CULTIVOS CELULARES	ANIMALES			
NDV NDV	FIBROBLASTOS DE POLLO —	POLLO RATON	Rm, Rp, AF/O-13 P C	4 horas antes a 4 horas despues (4 - 6 horas posterior (4 - 6 horas posterior	DISMINUCION DISMINUCION DISMINUCION
CHIKUNGUNYA	RATON	—	Act. D	10-14 horas posterior	LIGERO AUMENTO
ENDOTOXINA	—	RATON	P C	(4 - 6 horas posterior (4 - 6 horas posterior	AUMENTO AUMENTO
ENDOTOXINA	FIBROBLASTOS DE POLLO	POLLO	Rm, Rp, AF/O-13	4 horas antes a 4 horas despues	DISMINUCION
POLY I : C	CONEJO	RATON	P C	(4 - 6 horas posterior (4 - 6 horas posterior	SUPERINDUCCION SUPERINDUCCION
POLY I : C	CONEJO	—	Act. D	4 - 6 horas posterior	SUPERINDUCCION

P = PUROMICINA

C = CICLO-HEXIMIDA

Act. D = ACTINOMICINA D

Rm = RIFAMICINA

Rp = RIFAMPICINA

III. LA SUPERINDUCCION DE INTERFERON

En la mayoría de los diferentes tipos de cultivos celulares, el interferón empieza a ser sintetizado: dos horas después de la exposición del cultivo al inductor correspondiente y lo hace con una determinada capacidad de síntesis^(*) que alcanza un valor máximo a las tres horas. Poco después, la síntesis de interferón va declinando gradualmente hasta niveles indetectables con una velocidad casi tan rápida como empezó a aumentar. Desde los primeros trabajos con interferón se encontró que la actinomicina D, que bloquea el mRNA, producía una inhibición o depresión en la síntesis de interferón; y también fue demostrado en animales de laboratorio tratados con algunos inhibidores de la síntesis protéica, como puromicina y cicloheximida, que no se producía interferón al ser inoculado con NDV (YOUNGNER y cols. 1965; YOUNGNER y HALLUM, 1969).

Esta acción de los inhibidores sirvió, en su momento, para confirmar la hipótesis de la intervención del genoma celular del huésped. Después el gran número de trabajos posteriores

(*) Esta capacidad de síntesis se mide por la concentración intracelular o grado de acumulación de interferón en el líquido del cultivo celular.

han ido puntualizando mas el fenómeno y se ha visto que existe una relación entre el tiempo de administración de los inhibidores y la inoculación del virus, para que aparezcan estas inhibiciones; así, la cicloheximida, puede reforzar la aparición del interferón cuando es inducido, sobre todo, por endotoxinas bacterianas, poli I:C y tilorona; y lo mismo ocurre con la actinomicina D y puromicina.

Han pasado más de 10 años desde que se encontró que la cicloheximida también podía aumentar los niveles de interferón inducido por endotoxina en ratones, era la primera demostración de lo que posteriormente se habría de denominar superinducción del interferón. Esta superinducción conduce a un incremento en el rendimiento final de interferón mediante una prolongación del periodo durante el cual se produce interferón.

El término superinducción fue introducido por GARREN y cols (1964) para describir el aumento de producción de los enzimas inducidos por los esteroides tirosina aminotransferasa y triptófano pirrolasa en el hígado de rata tras inyección de actinomicina D. Por tanto, se refiere a la producción incrementada de una proteína inducible, en células expuestas a inhibidores de síntesis macromolecular y al inductor apropiado.

Aún antes de la publicación de los primeros trabajos sobre superinducción de enzimas en células de hígado de rata diversos autores (GARREN y cols., 1964; TOMKINS y cols. 1966) McAUSLAN, en 1963, describió un fenómeno similar en células HeLa infectadas con virus vacunal a las que de 2 a 4 horas después de la infección viral se añadió actinomicina D y puromicina,

encontrando un aumento paradójico en la síntesis de timidina kinasa; la síntesis de esta enzima, codificada tempranamente por el virus, comienza a declinar normalmente coincidiendo con la aparición de la síntesis de las proteínas tardías, alrededor de 6 horas después de la infección viral. Así, el caso de la síntesis de la timidina kinasa queda en función de un represor de proteína codificado por el virus que interfiere en la actividad del mRNA. Los resultados obtenidos en la experimentación ponían de manifiesto la posibilidad de que la superinducción fuera debida a la supresión de un mecanismo de regulación post-transcripcional de síntesis de interferón. Así la actinomicina D y la puromicina, interfieren la síntesis del represor. Los resultados de McAusland pueden ser considerados como la primera demostración convincente del control a nivel de traducción de una proteína.

El fenómeno de superinducción ha sido encontrado en buen número de otros sistemas incluyendo la producción de interferón en células eucarióticas (TOMKINS y cols. 1972), pero donde la superinducción ha llegado a ser una herramienta muy útil es en la producción de grandes cantidades de interferón en particular, cuando se ha aplicado la técnica sucesivamente en la producción de interferón en fibroblastos diploides humanos.

1. Aspectos bioquímicos de la superinducción de interferón

La superinducción de interferón fue primero demostrada por YOUNGNER y cols. (1965) en el curso de sus estudios sobre la naturaleza de la producción de interferón inducido en ratón por virus o endotoxina. Estos autores observaron que la producción de interferón inducida por NDV quedaba bastante reducida

tras la administración de diferentes dosis de cicloheximida al producir un fuerte efecto inhibidor sobre la síntesis de proteínas en el hígado de ratón. Sin embargo, las mismas dosis de cicloheximida mostraban un efecto muy diferente en la producción de interferón cuando éste era inducido por endotoxina bacteriana. En todos estos casos se encontraba un retraso inicial en la aparición de interferón en los ratones tratados con cicloheximida, pero a intervalos variables de tratamiento con la cicloheximida, los niveles de interferón en suero fueron mucho mayores con respecto a los ratones que solo recibieron la endotoxina bacteriana. Asimismo se ha comprobado (YOUNGER y cols. 1965) que la puomicina tiene un efecto similar al de la cicloheximida en cuanto a la producción de interferón inducido por endotoxina.

Por otra parte, también, al observar un fenómeno similar en cultivos de tejidos fue posible ir estudiando gradualmente los mecanismos relacionados con la superinducción de interferón. Así, ROSSMAN (1968) encontró que la adición de actinomicina D, a cultivos celulares de embrión de pollo, al cabo de 10 - 14 horas después de la infección con virus Chikungunya producía un ligero aumento en la producción de interferón. Posteriormente, se comprobó un aumento de esta producción que era más marcado en un cultivo de células de riñón de conejo tratado con actinomicina D a las 3,5 - 5,5 horas después de la inducción de interferón con poli I:C. Esta acción superinductora de la actinomicina D fue atribuida al bloqueo de un inhibidor endógeno de interferón (VILCEK y cols. 1969).

En un principio pareció difícil coordinar el hecho de la presencia de moléculas supresoras de la síntesis proteica,

en el medio de cultivo celular, con la noción de que en estas condiciones se aumentara la producción del interferón cuando éste es de naturaleza protéica y se sintetiza y libera tras la inducción. Pero el fenómeno es así y parece suficientemente comprobado, ya que en un principio se produce una inhibición que va seguida de una prolongación en el tiempo de su formación para, posteriormente, conseguir el aumento del nivel de interferón inducido (VILCEK y cols. 1969; FINKELSTEIN y cols. 1968; VILCEK, 1970).

En cultivos de fibroblastos humanos diploides se ha observado que después de la inducción de interferón con RNA de doble cadena, generalmente poli I:C, podía provocarse una superinducción por adición, en tiempos previamente determinados, de inhibidores de síntesis de proteína y RNA, pudiendo encontrar un aumento de 10 a 50 veces en el rendimiento de interferón respecto al obtenido en una inducción química o viral única (BILLIAU y cols. 1973; HAVELL y VILCEK, 1972; HO y cols. 1972). Este estudio se ha continuado posteriormente (NG y VILCEK, 1972; VILCEK y HAVELL, 1973; VILCEK y cols. 1975) con resultados análogos.

Es interesante destacar que la superinducción de interferón se haya observado cuando se utilizan cultivos celulares normales (diploides) casi exclusivamente (TAN y cols. 1970; VILCEK, 1970; VILCEK y NG, 1971), mientras que no se ha podido observar esta superinducción en células L (de línea y, por tanto, transformadas); ello implica que no tendrían o no expresarían un mecanismo regulador normal para la producción de interferón.

VILCEK y cols. (1976) postulan que, en esencia, el efecto de cualquier inhibidor metabólico sobre la producción de interferón en este sistema, representa la suma de dos acciones: la acción de la producción de interferón en sí misma y la acción sobre la síntesis de una proteína reguladora que ejerce un control negativo sobre la producción de interferón a nivel transcripcional (SEHGAL y TAMM, 1976a; CAVALIERI y cols. 1977; RAJ y PITHA, 1977; SEHGAL y cols. 1977). La función de esta proteína reguladora hipotética es bloquear la síntesis de interferón 4 horas después de la inducción. Uno de los efectos esperados en estas condiciones para los inhibidores metabólicos, sería producir unas veces, una inhibición o descenso en la producción de interferón, mientras que en otras ocasiones nos encontraríamos con una prolongada producción de interferón; estos efectos ya han sido, así, demostrados y su interpretación es compatible con los resultados de los experimentos en los que los inhibidores metabólicos son añadidos a tiempos distintos durante el proceso de inducción tanto en cultivos (VILCEK, 1970) como en los encontrados en ratones (YOUNGNER y cols. 1965; YOUNGNER y HALLUM, 1968; YOUNGNER, 1970 a, b).

Otros estudios de TAN y cols. (1970), utilizando el modelo de inducción de interferón por poli I:C, en cultivos celulares de riñón de conejo con tratamientos posteriores a base de actinomicina D y algunos otros inhibidores de la síntesis proteica han proporcionado una evidencia más en favor de las nociones de que todo interferón es sintetizado "de novo" en este sistema y que la síntesis del mismo está sujeta a regulación post-transcripcional por una proteína celular controladora. Estudios posteriores, con inhibidores metabólicos, han corroborado estas conclusiones (VILCEK y NG, 1971; TAN y cols. 1971).

Con el fin de aclarar el mecanismo de la superinducción, REYNOLDS y PITHA (1974) compararon el nivel de mRNA del interferón presente en células en condiciones de superinducción con el existente en células solamente inducidas por el método normal. Así, los autores encontraron que el grado de síntesis de interferón era paralelo a la cantidad medida de un mRNA traducible. Las células superinducidas contenían mayor cantidad de este mRNA traducible que las normalmente inducidas y el grado de síntesis de interferón parece ser proporcional al nivel de mRNA existente, por lo cual, parece bastante improbable explicar el fenómeno de la superinducción a nivel de la traducción.

Los experimentos más recientes cuya finalidad es aclarar y explicar el mecanismo de la superinducción sugieren que la traducción del mRNA del interferón, por ejemplo, en fibroblastos diploides humanos inducidos por poli I:C, está regulada por un mecanismo represor que inactiva o degrada el mRNA del interferón (VILCEK y cols. 1976; SEHGAL y cols. 1977; TAMM y SEHGAL, 1978). Este mecanismo parece implicar la síntesis de un mRNA "turnover" que conduce a una inhibición en la traducción del mRNA del interferón inducido por poli I:C (VILCEK y cols. 1969; TAN y cols. 1970; SEHGAL y cols. 1975, 1976; SEHGAL y TAMM, 1976; TAMM y SEHGAL, 1978). Finalmente, en cuanto al empleo de inhibidores metabólicos, SEHGAL y cols. (1978) analizaron el efecto del 5,6-dicloro-1B-D-ribofuranosilbenzimidazol (DRB), que es un inhibidor selectivo y reversible de la síntesis del mRNA (TAMM y SEHGAL, 1978), sobre la producción de interferón inducido por poli I:C en cultivos de fibroblastos diploides humanos (cepa FS - 4) observaron que aparece un incremento aproximado de 10 veces en el rendimiento de IF acumulado en las primeras 24 horas de inducción (SEHGAL y cols. 1975; SEHGAL y TAMM, 1976; TAMM y SEHGAL, 1978).

2. Aplicaciones clínicas de la superinducción

Partiendo del supuesto de que la superinducción permite incrementar el rendimiento en interferón, entre otros casos, en cultivos de células diploides humanas, particularmente cuando se emplea en combinación con inductores polinucleótidos como poli I:C (VILCEK y HAVELL, 1973; MYERS y FRIEDMAN, 1971; HO y cols. 1972; BILLIAU y cols. 1973; HAVELL y VILCEK, 1972), parece lógico pensar que se pretenda utilizar como posible agente antiviral, aunque antes se hace preciso resolver ciertas dificultades y conseguir una normalización de esta producción en cuanto a características biológicas.

Se ha demostrado que el tipo de interferón producido en cultivos primarios de leucocitos humanos (STRANDER y CANTELL, 1967) y el procedente de células diploides humanas difieren en varias características importantes. En efecto, practicando una electroforesis en gel de poliacrilamida con interferón de leucocitos humanos, bajo condiciones desnaturalizadas se obtienen dos especies moleculares distintas con peso molecular de $1,5 \times 10^4$ y $2,1 \times 10^4$ daltons respectivamente (STEWART y DESMYTER, 1975), mientras que el interferón procedente de fibroblastos humanos da lugar a una única especie electroforéticamente homogénea con un Pm de 2×10^4 daltons (KNIGHT, 1976). Más aún, los distintos interferones humanos procedentes de distintas fuentes son antigénicamente distintos unos de otros (BERG y cols. 1975; HAVELL y cols. 1975) e incluso el interferón inmune inducido en linfocitos T sensibilizados estimulados con un antígeno específico, probablemente representa una tercera especie antigénica de interferón humano (VALLE y cols. 1975).

Pese a todas estas diferencias encontradas entre los interferones citados, en un hecho patente que la mayoría inducen el estado antiviral en la célula a través de mecanismos estrechamente relacionados (si no idénticos), aunque sus respectivas potencias antivirales puedan variar frente a los distintos virus, según las distintas circunstancias relativas a su producción.

Todos estos estudios parecen sugerir que el interferón humano, obtenido por medio de la superinducción de cepas celulares diploides cultivadas, pueda ser aplicado en un futuro próximo como agente antiviral en Clínica y de ello existen algunos antecedentes en oftalmología y en el tratamiento de ciertos tipos de tumores. Quizá ello sea la razón del incremento de publicaciones últimamente observado en la bibliografía científica y que se refieren al interferón, sus mecanismos, propiedades y posibles aplicaciones.

IV. MECANISMOS DE RESPUESTA ANTIVIRAL DEL HUESPED

Durante muchos años los anticuerpos se consideraron el principal mecanismo de defensa del huesped contra las infecciones virales, hasta que en 1957 se descubriera un segundo mecanismo: el interferón. Esta sustancia actúa a nivel celular y evita la replicación viral inhibiendo la síntesis de proteínas virales a nivel de la transcripción, la traslación o ambas. En la década de los años 60 se identifica un tercer mecanismo de defensa antiviral constituido por la inmunidad celular.

Ha quedado pues plenamente demostrado que el organismo ante una infección viral reacciona mediante una inmunorespuesta propiamente dicha y por la aparición de interferón activo.

Las diferencias principales entre las respuestas inmunohumoral e interferón quedan representadas en el cuadro III.

1. Sobre la inmunorespuesta antiviral

Como es sabido la memoria, especificidad y reconocimiento de lo "extraño" es la base de la reacción inmunitaria de defensa de un organismo. Esta respuesta inmune aparece en etapas relativamente avanzadas en la evolución, encontrándose ya a nivel de los vertebrados y alcanzando su máxima complejidad en los mamíferos (SMITH y cols. 1966; WHITEHOUSE, 1962; GOOD y

PRINCIPALES DIFERENCIAS ENTRE ANTICUERPOS E INTERFERON

ANTICUERPOS

INTERFERON

Aparición retardada _____ Aparición precoz.

Activo frente a virus con
antígenos compartidos _____

Amplio espectro antiviral.

Actúa in vitro e in vivo _____ Actúa solo en presencia
de la célula huésped.

Se inactiva por pH. extremos _____ Estable entre pH 2 y pH 10.

cols. 1971, GOWANS, 1971). Durante el desarrollo embrionario y periodo perinatal se adquiere la especificidad inmunológica, y es, entonces cuando el organismo instruye específicamente a sus futuras células inmunocompetentes, eliminando la posibilidad de producir anticuerpos contra si mismo.

En relación con los virus raramente un organismo sufre por dos veces la misma enfermedad infecciosa (por ejemplo parotiditis, sarampión, etc); el primer contacto con un organismo infeccioso imprime información en el huesped que posee a partir de entonces "memoria" estando preparado para repeler cualquier infección posterior con el mismo agente. En cuanto a la especificidad, la memoria inmunológica frente a un virus determinado, no confiere protección contra otro no relacionado con el anterior. El cuerpo o huesped puede diferenciar específicamente entre dos organismos. Esta es la razón que puedan sufrir-se distintas infecciones gripales al producirse variaciones antigénicas en el virus por recombinaciones genéticas entre distintas cepas de virus al recombinarse fácilmente el genoma fragmentado, típico, de los orthomixovirus dando lugar a mutantes completamente diferentes a los organismos parentales y finalmente, la capacidad de reconocer un antígeno y distinguirlo de otro va aún más lejos, ya que el individuo debe también reconocer que es una partícula extraña, no propia; el fallo en la discriminación sobre lo propio y lo extraño puede conducir a la producción de anticuerpos dirigidos contra el propio organismo produciéndose "autoanticuerpos" o un fenómeno de autoagresión.

1.1. Los virus como antígeno

Los antígenos pueden ser particulados (bacterias, virus, eritrocitos de otras especies) o bien solubles (proteínas,

polisacáridos o combinaciones de ambos, sólo o con lípidos). En general se ha comprobado que sustancias con pesos moleculares menores de 5.000 - 10.000 daltons no actúan como antígenos, incrementando la capacidad antigénica o capacidad para estimular una respuesta inmune con la medida molecular. Debemos tener en cuenta la existencia de unos compuestos de bajo peso molecular que no pueden inducir respuesta de anticuerpos por ellos mismos y que precisan de un portador proteico; entre los utilizados más frecuentemente en la investigación inmunológica corriente encontramos el dinitrofenol (DNP) y el nitroiodofenol (NIP). En cuanto a las sustancias derivadas de organismos vivos son usualmente antigénicas sólo en especies distintas a la de su procedencia y lo más distante posible desde el punto de vista genético. Por ejemplo, el ratón es capaz de dar una respuesta frente a hematíes de carnero (SRBC) con respuesta más pobre frente a eritrocitos de rata y nula frente a sus propios glóbulos rojos.

Desde nuestro punto de vista, lo que mas nos interesa es el aspecto antigénico de los virus que, en general, cabe decir que está condicionado por las estructuras periféricas y por tanto por las proteínas de la cápsida, aunque también pueden obtenerse, en estructuras mas complejas, antígenos específicos frente a las espículas o frente a la cola de fagos, etc.

En nuestro caso particular, y por ser los virus con los que hemos trabajado, haremos un estudio mas detallado de los Mixovirus y su caracter antigénico. Así cabe decir que si bien el termino Mixovirus, debido a ANDREWS y cols. (1955), es relativamente reciente, las enfermedades producidas por los virus englobados en el grupo, se conocen desde hace cientos de años. La elección del término se basó en la observación de que todos

los mixovirus tenían cierta afinidad común por determinados receptores mucoproteicos, así como propiedades físicas y biológicas compartidas (HORNE y WILDY, 1961; WATERSON, 1962; COMPANS y CHOPPIN, 1971); por ejemplo, la capacidad para adsorber eritrocitos de pollo y otras especies animales, causando el fenómeno conocido por hemaglutinación. Los miembros de este grupo de virus coexisten en una misma variedad de especies vertebradas causando infecciones en el aparato respiratorio, aunque algunos, como el influenza aviary varios paramixovirus causan enfermedades generalizadas.

Los seis miembros iniciales fueron: influencias tipo A, B y C; el FPV, NDV y de la parotiditis; los cuales posteriormente, se dividieron en dos grupos basandose en la naturaleza del virión. Estos dos grupos actualmente denominados orthomixovirus y paramixovirus tienen de común el poseer una ribonucleoproteína helicoidal y una envuelta de naturaleza lipídica que, en su mayor parte, deriva de la célula huésped, que posee una gran afinidad para las mucoproteínas y porta glicoproteínas codificadas por el virus (ROTT y KLENK, 1977), mientras que difieren en casi todos los caracteres restantes (WATERSON, 1962).

Más tarde, el grupo paramixovirus se ha visto relacionado con un grupo compuesto por otros tres virus: sarampión, peste bovina y moquillo, siendo todos ellos morfológicamente idénticos y también estrechamente relacionados desde el punto de vista serológico exceptuando el NDV (WATERSON y ALMEIDA, 1966).

Las relaciones quedan representadas en la Figura 4.

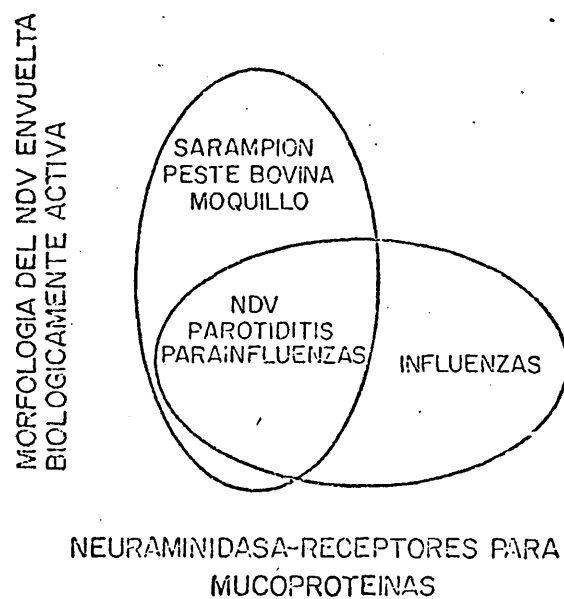
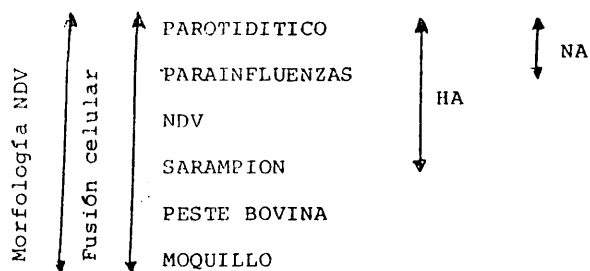


Fig. 4.- Parentesco biológico y relación entre distintos grupos de mixovirus.

Los grupos paramixovirus y el virus del sarampión están relacionados como se indica en la Figura 5.



Son morfológicamente idénticos, pudiendo causar la fusión de las células infectadas; por otra parte, los virus del sarampión, peste bovina y moquillo están relacionados serológicamente entre sí, pero no con el resto de los virus citados en la tabla. Como se indicó, los tres primeros virus poseen neuraminidasa y el virus del sarampión aglutina eritrocitos de mono.

Los mixovirus constituyen un grupo o modelo de estudio excelente dentro de los virus RNA, habiendo sido elegidos para estudio de infecciones virales lentas, virus RNA tumorales e infecciones en superficies de células animales.

Según la clasificación de FENNER (1976) los mixovirus, que sólo se multiplican en vertebrados, se dividen en dos familias que a su vez poseen los géneros siguientes:

FAMILIA	GENERO
ORTHOMIXOVIRIDAE	VIRUS INFLUENZA
	PARAMIXOVIRUS (1)
PARAMIXOVIRIDAE	MORBILLIVIRUS (2)
	PNEUMOVIRUS (3)

- (1) Agentes que contienen neuraminidasas, incluyendo virus parainfluenza, NDV, ~~SVS~~ y Sendai
- (2) Sarampión, peste bovina, moquillo y otros agentes con morfología paramixovirus típica pero sin neuraminidasa.
- (3) Virus sincitial respiratorio, morfológicamente distinto, y virus de la neumonía de ratones

Esta clasificación se mantiene en la actualidad sin cambio alguno (MATTHEWS y MAURIN, 1979).

Los viriones de ambas familias contienen además del RNA (1%) y proteína (70%), un 20-30% de lípidos y algún carbohidrato (FROMMHAGEN y cols., 1959; SCHAFER, 1963 ; LAVER y WEBSTER, 1966; KLENK y CHOPPIN, 1969). La similitud estructural de ambas familias incluye la presencia de una envuelta lipídica o bicapa lipídica que rodea la nucleocápsida o ribonucleoproteína helicoidal interna y que consta de una membrana externa cubierta con proyecciones o espículas compuestas de lipoproteínas (COMPANS y cols, 1970; CHEN y cols. 1971) y en su cara interna porta una proteína especial denominada proteína M.

En cuanto a diferencias estructurales entre ortho y paramixovirus. Aunque todos los mixovirus siguen el mismo modelo estructural (ROTT y KLENK, 1977) existe una serie de diferencias entre ortho y paramixovirus que los distinguen claramente (WATERSON, 1962; COMPANS y CHOPPIN, 1971) como se puede apreciar en el Cuadro IV.

CUADRO IV.- Diferencias estructurales entre ortho- y paramixovirus

CARACTERISTICAS	ORTHOMIXOVIRUS	PARAMIXOVIRUS
Diámetro virión (Å)	800 - 1000	1200 - 4500
Diámetro nucleocápsida (Å)	90 - 150	170 - 180
Longitud nucleocápsida (Å)	500 - 1300	10000
Longitud de la proyección (Å)	aprox. 100	aprox. 80

Podemos encontrar gran variación de forma y tamaño entre los dos grupos de mixovirus: además de viriones más o menos esféricos, encontramos otros más alargados o filamentosos. En un principio se pensó que esta última forma era característica de orthomixovirus, sin embargo, se han encontrado también estas estructuras dentro de los paramixovirus y en general, se pueden encontrar formas pleomórficas en ambos grupos.

En relación con la nucleocápsida que es una de las características que diferencia a ambos grupos virales, los orthomixovirus poseen nucleocapsida con diametro mucho más pequeño que en paramixovirus; por otra parte, cuando se aísla de los viriones se presenta en múltiples fragmentos cortos, mientras que en paramixovirus la nucleocápsida es una entidad única con diametro y longitud mucho mayor.

En el RNA se puede señalar que el material genético de orthomixovirus está compuesto de 8 segmentos cada uno de los cuales representa un gen que codifica una proteína específica, mientras que los paramixovirus presentan un RNA no interrumpido (SCHULTISSEK, 1978). Esta particular estructura del RNA viral explica varias peculiaridades biológicas de orthomixovirus, especialmente su alto grado de recombinación, fenómeno que no presenta el grupo paramixovirus.

Diferencias estructurales relacionadas con las espi-
culas o proyecciones residen en que son más largas en orthomixovirus que las que presentan los paramixovirus; estas formaciones poseen actividades hemaglutinantes y neuraminidásicas así como la antigenicidad cepa-específica del virión dando lugar

a propiedades biológicas diferentes. En orthomixovirus de las dos glicoproteínas presentes, la hemaglutinante adsorbe el ácido siálico contenido en los receptores de la célula huésped para iniciar el ciclo replicativo del virus. La segunda glicoproteína, neuraminidasa, ataca las uniones α -quetosídicas entre el ácido siálico y otros carbohidratos. La significación funcional de esta enzima no se ha esclarecido aún totalmente (ROTT 1977; ROTT y FLENK, 1977).

En paramixovirus ambas actividades: capacidad de adsorción y actividad neuraminidasa coexisten en la glicoproteína dando lugar a un complejo para hemaglutinina-neuraminidasa, HN, presentando otra glicoproteína F responsable de la hemólisis fusión celular y penetración viral (ROTT y KLENK, 1977); de estos componentes haremos mención detallada en el momento oportuno.

Tras los estudios citológicos efectuados por distintos investigadores (TRAVER y cols. 1960; WATERSON, 1962) se ha sacado la conclusión de que la síntesis de todos los componentes de los paramixovirus tienen lugar en el citoplasma de la célula huésped y las alteraciones morfológicas relacionadas con la replicación viral incluye la acumulación de gran número de nucleocápsidas; sin embargo, el virus del sarampión constituye una excepción a este hecho.

Los orthomixovirus producen un acúmulo de la ribonucleoproteína viral en el núcleo de las células infectadas (BREITENFELD y SCHAFER, 1957; WATTSON y COONS, 1954; WATERSON, 1962) y tanto el núcleo como el citoplasma de estas células infectadas presentaban cambios morfológicos.

La salida de los mixovirus, ortho y para, de la célula huésped tiene lugar a través de la superficie celular por proceso de gemación ("budding") y a través de la membrana plasmática (MURPHY y BANG, 1952; MORGAN y cols. 1956). Posteriormente se observó (COMPANS y cols. 1966; COMPANS y DIMMOCK, 1969; COMPANS y CHOPPIN, 1971; CHOPPIN y cols. 1971) que las proteínas de la envuelta viral se almacenaban en algunas regiones de la membrana celular; acúmulos que en los primeros estadios de la infección no pueden ser diferenciados morfológicamente dentro de la membrana normal pero si pueden detectarse utilizando anticuerpo antiviral marcado con ferritina.

La nucleocápsida viral queda alineada por debajo de las áreas que contienen las proteínas virales en tanto que en la parte externa de ellas aparece una capa seriada de proyecciones superficiales que corresponden a las espículas que completarán el virión maduro. Después del ensamblado, el virión sale de la célula, existiendo un momento en el que la membrana plasmática de la célula huésped presenta continuidad con la cápsida viral. La cápsida viral contiene proteínas específicas del virus diferentes de las proteínas de la membrana celular; incorporadas durante la salida del virus; en cuanto a los lípidos, se incorporan, en mayor o menor proporción, los pertenecientes a la membrana celular y la porción carbohidrato de las glicoproteínas virales, parece estar en parte, también, especificada por la célula huésped (CHOPPIN y cols. 1971).

No aparece ácido neuramínico ligado a proteína o lípido en el virión debido a la acción localizada de la neuraminidasa viral que se incorpora en las zonas de membrana que llegan a constituir la envuelta viral (KLENK y cols. 1970 b).

Caracter antigénico de los mixovirus. Como ya hemos señalado anteriormente las espículas que presentan tanto para- como orthomixovirus, poseen unas proteínas denominadas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA): a) la hemaglutinina presenta forma de varillas triangulares, monovalentes y que se unen a los receptores celulares por el extremo libre, hidrofílico, mientras que el otro extremo, hidrofóbico, forma lipoproteínas ligada a la bicapa lipídica del virión; b) la neuraminidasa funcional es un tetrámero en forma de varilla con un extremo fibroso hidrofóbico que interacciona con la capa lipídica de la célula receptora. Del total de espículas presentes en el virión, las HA representan más del 90% y las NA aproximadamente el 10% (BUCHER y KILBOURNE, 1972; LAVER y KILBOURNE, 1966; KENDAL y ECKERT, 1972; LAZDINS y cols. 1972; DRZENIEK y cols. 1968).

En relación con la familia orthomixovirus podemos distinguir:

i) Antígeno HA.

LAVER (1969), LAVER y cols (1969 y 1973) aislaron las espículas HA por tratamiento con detergente (deoxicolato sódico. Tween 40, SDS) y separaron los antígenos HA y NA por adsorción del primero a glóbulos rojos. Estos autores purificaron las espículas por electroforesis en gel de poliacrilamida, observando que contenía una glicoproteína única de Pm 77.000 que posteriormente se podía disociar en dos glicoproteínas más pequeñas con Pm HA₁:55.000 y HA₂: 25.000, tras un tratamiento con agentes reductores. Esto es, se encontraban entre un polipéptido HA, compuesto por 2 polipéptidos más pequeños unidos por puentes disulfuro. De los pesos moleculares estimados para las espículas parece ser que cada una de tales espículas contiene 2 ó 3 moléculas HA.

En algunas ocasiones, aunque los virus contengan HA₁ y HA₂, como sucede en bastantes cepas de virus influenza, ocurre que algunos virus que crecen en células de riñón de carnero presentan una única glicoproteína HA de Pm 77.000 que no se disocia en glicopéptidos pequeños por la acción de agentes reductores (WHITE y cols. 1970).

La hemaglutinina purificada presenta forma filamentosa (14 mm x 4 mm)

ii) Antígeno NA

Constituye una enzima glicoproteica de Pm que varia desde 45.000 hasta 70.000 daltons. Está localizada en la envuelta viral como componente de la proteína espicular siendo funcional como dímero o tetramero (LAVER y LAVENTINE, 1969; BUCKER y KILBOURNE, 1972; LAVER y KILBOURNE, 1966; KENDAL y ECKERT, 1972; LAZDINS y cols. 1972; WRIGLEY y cols. 1973).

No se conoce claramente el papel de la neuraminidasa en la biología del proceso infectivo, estando claro que juega un papel significativo en la replicación del virus tanto en animales como en cultivos celulares facilitando la infección célula a célula.

iii) Antígeno NP ó RNP

Es el más abundante de las proteínas virales de tipo estructural en células infectadas, no estando asociada con la membrana celular específica. Mas del 80% de este antígeno está presente en el sobrenadante postmicrosomal (COMPANS, 1973). Tras su síntesis, el NP queda acumulado en el núcleo eventualmente hacia el citoplasma (TAYLOR y cols. 1970).

No está claro si la fase nuclear del NP es necesaria para la replicación viral y es posible que la fase intranuclear no sea significativa en biología viral.

Para la localización y desarrollo de antígenos virales se ha estudiado la cinética de desarrollo de 3 antígenos virales principales (HA, NA y RNP) mediante técnicas de inmunofluorescencia en cultivos celulares y en animales experimentales, utilizando anticuerpos contra antígenos V (que contienen HA y NA) y antígenos G (que contiene NP) en los primeros estudios (LIU, 1955; BREITENFELD y SCHÄFER, 1957; HOLTERMAN y cols. 1960) y anticuerpos no específicos contra HA, NA y NP en estudios posteriores (MAENO y KILBOURNE, 1970) siendo los resultados esencialmente iguales.

Entre los antígenos virales citados el NP fue el primero que se detectó, normalmente 3 horas después de la infección, y una hora antes de que apareciera el antígeno HA. Tanto HA como NA, aparecen primero en el citoplasma 4 horas después de la infección, permaneciendo en el mismo y concentrándose posteriormente sobre la membrana plasmática.

El conjunto de estudios llevados a cabo muestran que los distintos antígenos virales son procesados a través de distintos orgánulos subcelulares y eventualmente se acumulan sobre la superficie celular cuando ocurre la gemación del virión.

En relación con la familia paramixovirus, se pueden distinguir los siguientes antígenos:

i) Glicopolipéptido HN

En un principio se pensó que los activadores antigénicos HA y NA de paramixovirus también residían en polipeptidos diferentes (IINUMA y cols, 1971; MAENO, 1970, POPA y cols, 1975) como ocurría en la familia orthomixovirus (WILCOX, 1959) pero resultados más recientes indicaron que poseían una especie única de glicoproteína que englobaba diversas funciones (PIERCE y HAYWOOD, 1973; PORTNER y cols. 1975; SCHEID y cols. 1972; SCHEID y CHOPPIN, 1973, 1974; SETO y cols. 1974; SHIMIZU y cols. 1974; TOZAWA y cols. 1973). Este complejo HA-NA se denominó HN (SCHEID y CHOPPIN, 1974) con un Pm de 70.000

El tratamiento de viriones paramixovirus con detergentes no iónicos libera todas las espículas en forma de lípidos libres sin romper las interacciones proteína-proteína. Mediante centrifugación en gradiente de densidad o por cromatografía de afinidad en columnas que contengan fetuina, sustrato para la neuraminidasa, se pueden citar las espículas que contienen el polipéptido HN con las actividades HA y NA (SCHEID y cols. 1972; SCHEID y CHOPPIN, 1973 y 1974).

Los procedimientos para el aislamiento de espículas HN indican que este polipéptido reside en espículas diferentes de otras que contienen un glicopolipéptido mayor denominado F.

La función NA puede perderse en condiciones no permisivas (por ejemplo de temperatura), no manifestando actividad neuraminidasa ni las células infectadas ni las partículas vira-

les liberadas en estas condiciones.

A la pregunta ¿cual es el papel de la neuraminidasa en la replicación viral? no hay respuesta concreta ni para orthomixovirus, ni para los paramixovirus, durante todos estos años se han postulado distintas posibilidades desde actuación durante la entrada del virus en la célula hasta un papel en la liberación del virus (RUBIN, 1957; SETO y ROTT, 1966).

Los resultados obtenidos en estudios con mutantes de virus influenza deficientes en actividad NA han indicado que las neuraminidasas virales parecen actuar in situ durante la maduración viral, eliminando residuos de ácido siálico de las glicoproteínas próximas, virales o celulares (KLENK y cols., 1970 a y b).

ii) Glicopolipéptido F

En los estudios con NDV, Sendai, SV5, etc. apareció un segundo glicopolipéptido importante en la envuelta viral al que se denominó F "factor de fusión". Posee un Pm de 50.000 y es mas pequeño que HN.

Los estudios efectuados hasta el momento sostienen su participación en la entrada del virus en la célula huésped, en la fusión celular, por acción viral y hemólisis, que son a veces manifestaciones artificiales de la misma actividad (ADAMS, y PRINCE, 1957; BACHI y cols, 1973; BRATT y GALLAGHER, 1969; BRATT y CLAVELL, 1972; CLAVELL y BRATT, 1972; GALLAGHER y BRATT, 1974; GRANOFF y HENLE, 1954; HOWE y MORGAN, 1969; KILHAM, 1949; MORGAN y HOWE, 1963; MORGAN y cols, 1948; NEURATH y cols. 1972; WAINBERG y HOWE, 1973).

El descubrimiento de este factor F está ligado al estudio del virus Sendai multiplicado en células L u otro tipo de células de mamífero en cultivo, en los que no presentaba infectividad para tales células aunque el título hemaglutinante era bastante alto, siendo sin embargo infectivo en huevos embrionados (ISHIDA y HOMMA, 1961; MATSUMOTO y MAENO, 1962).

La electroforesis en gel de poliacrilamida puso de manifiesto que este virus, multiplicado en células de mamífero, no poseía glicopolipéptido F teniendo en su lugar otro glicopolipéptido mayor (Pm 65.000) que migraba entre HN y NP (HOMMA y OHUCHI, 1973; SCHEID y CHOPPIN, 1974).

El tratamiento con tripsina convirtió este glicopolipéptido en otro del tipo F al mismo tiempo que confería infectividad a las partículas virales sometidas a dicho tratamiento. Este nuevo glicopolipéptido se denominó F_0 (SCHEID y CHOPPIN, 1974).

En huevos embrionados parece ser que tiene lugar, de una forma natural, la función proteolítica que transforma F_0 en F, por lo que, en estas condiciones se manifiesta una ausencia de F_0 y la infectividad está en estado de activación.

Aunque el factor F es muy importante para la capacidad de fusión del virus, no es suficiente su presencia para funcionar como tal factor de fusión por sí sólo, HOSAKA y cols. (1972 a y b, 1974 y SHIMIZU y cols., 1972), en una serie de estudios experimentales llegaron a la conclusión que la fusión requiere la presencia de fosfolípidos de membrana y el polipéptido HN además de F; así por ejemplo, el mutante Ts271 del virus Sendai, que contiene el factor F, únicamente, es incapaz de in-

fectar, fusionar o hemolizar células puesto que está ausente la HN que interviene en el ataque virus-célula (PORTNER y cols. 1975).

Como resumen de cuanto llevamos dicho, presentamos la figura 6 en la que se hace una representación esquemática de los diferentes antígenos existentes en la cápsida de los mixovirus.

1.2. La respuesta inmune

Como es sabido la respuesta inmune normal consta de dos tipos de reacciones

- a) Humoral: que depende de la existencia de células especializadas, plasmáticas, capaces de sintetizar y liberar anticuerpos circulantes o células B.
- b) Celular: en la que se originan células inmunocompetentes, células T, específicamente sensibilizadas para reaccionar de una manera activa frente al antígeno.

No nos ocuparemos de dar un conocimiento detallado de genética y estructura de inmunoglobulinas para comprender la inmunología humoral básica, pero es importante, en esta revisión, tener en cuenta los puntos siguientes:

- a) Las inmunoglobulinas constituyen una familia de proteínas que poseen cuatro cadenas polipeptídicas, dos ligeras y dos pesadas, ligadas todas ellas por puentes disulfuro.
- b) Los miembros difieren en su estructura primaria y cada una de las cadenas posee una región constante y otra variable cuya secuencia de aminoácidos difiere enormemente de una cadena a otra.

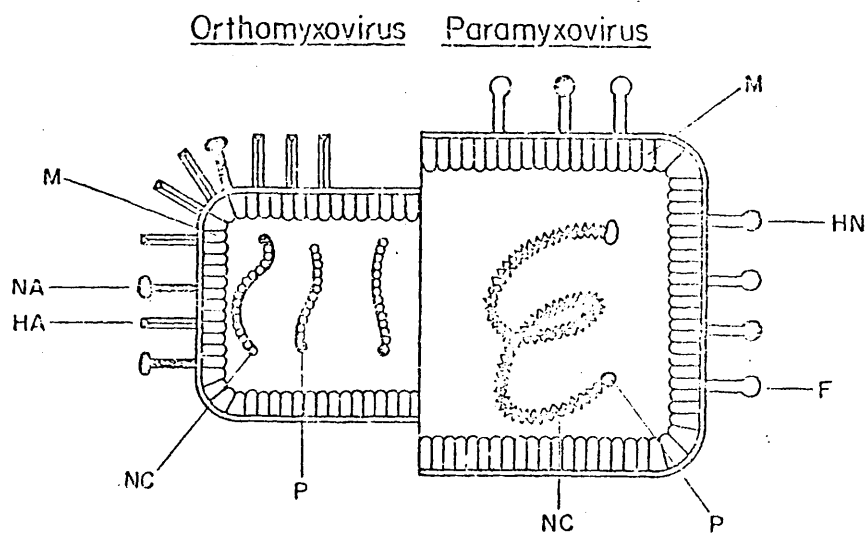


Fig. 6.- Diagrama de las diferencias antigénicas entre ortho- y paramyxovirus. P: RNA polimerasa; NC: nucleocápsida; M: proteína de membrana; HA: hemaglutinina; NA: neuraminiada; F: factor de fusión; HN: complejo hema- glutinina-neuraminidasa.

- c) Las regiones constante y variable son codificadas por genes distintos pero la cadena polipeptídica que contiene ambas regiones, es traducida por un único mRNA.
- d) Cada animal posee un número pequeño de genes para codificación de la región constante de sus inmunoglobulinas y un número grande para las porciones variables.
- e) Constituyen un grupo heterogéneo de proteínas que migran electroforéticamente en la región de las globulinas del suero.

En la Fig. 7 quedan representados todos los datos existentes para este tipo de molécula que según HUBER (1976) constituyen estructuras flexibles que se hacen rígidas cuando interaccionan con su antígeno específico. La fracción anticuerpo del suero consta predominantemente de un grupo de proteínas con un Pm aproximado de 150.000 (7S de coeficiente de sedimentación) del cual el componente mayor es la IgG y otro la Pm 900.000 correspondiente a la IgM (19 S). Los anticuerpos IgG pueden dividirse en tres fragmentos por la acción de la papaina. Dos de ellos son idénticos y capaces de combinarse con el antígeno para formar un complejo soluble que no precipitará. Estos fragmentos se denominan Fab (fragment antigen binding). El tercer fragmento no tiene poder para combinarse con el antígeno y es llamado Fc (fragment crystallizable). Otra enzima proteolítica, la pepsina, separa la porción Fc del resto de la molécula anticuerpo dejando un fragmento (5 S) que puede aún precipitar con el antígeno y es denominado F (ab')₂ por ser claramente divalente.

Las cadenas peptídicas de distinto tamaño, son denominadas ligera y pesada (FLEISCHMAN y cols. 1962; WILLIAMSON, 1976). Cada cadena ligera y pesada, es traducida como una cadena continua sobre los polisomas a partir de su amino terminal. La síntesis

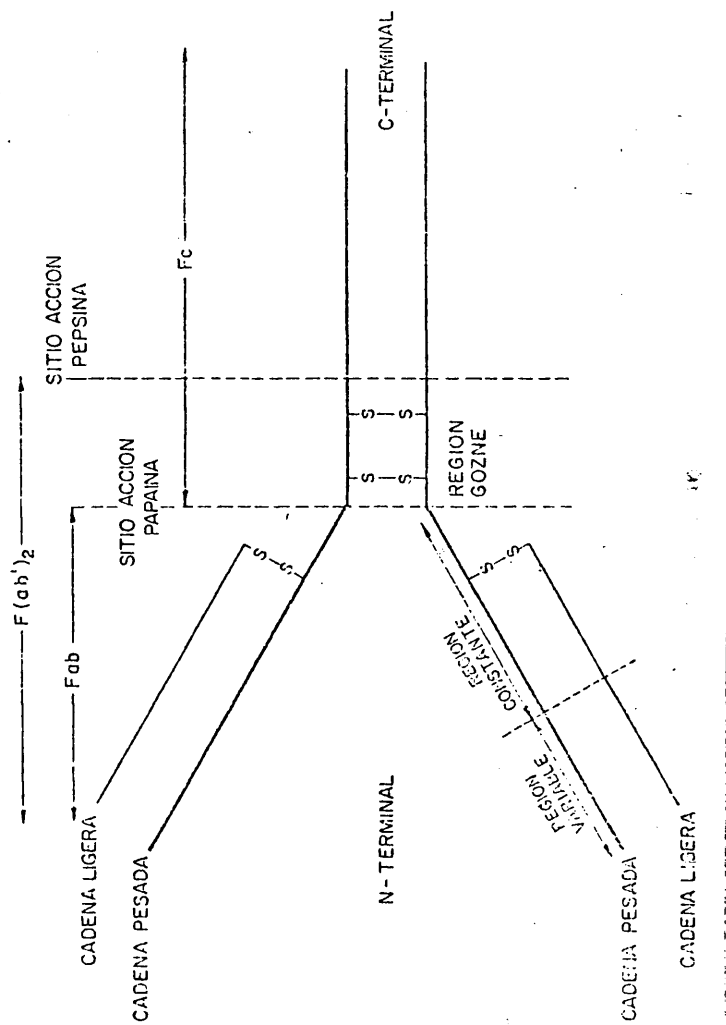


Fig. 7.- Esquema de la estructura de una molécula de inmunoglobulina.

sis de inmunoglobulinas parece en efecto seguir las mismas reglas que la producción de cualquier otro producto celular diferenciado (BEVAN y cols. 1972).

Estas cadenas son sintetizadas independientemente y la molécula de inmunoglobulina se constituye en el citoplasma donde se unen las cadenas.

Se ha comprobado que las células matriz derivadas del hígado durante estadios tempranos o posteriores de la embriogénesis, o de la médula ósea después del nacimiento, se diferencian inicialmente en células B portadoras de IgM. Posteriormente, algunas se diferencian en linfocitos B portadores de IgG a IgA (KINCADE y COOPER, 1971; KINCADE y COOPER, 1973; COOPER y cols. 1972; COOPER y cols. 1974).

Cuando los linfocitos B son estimulados por antígenos apropiados, se diferencian como ya se ha explicado, en células plasmáticas que sintetizan distintas clases de inmunoglobulinas o continúan en circulación como células de memoria sensibles al antígeno (COOPER y cols. 1972). Las células productoras de IgG aparecen entre las que sintetizan IgM en los folículos bursales aviares, y muchos linfocitos bursales IgG también contienen IgM durante el desarrollo temprano (COOPER y cols. 1974). Durante el desarrollo y maduración de la respuesta inmune humoral, las células productoras de anticuerpo son alojadas en el tejido linfoide de varios órganos. El adulto normal contiene gran número de estas células en el bazo, médula ósea, nódulos linfoides, en el tejido glandular, y en las superficies mucosas externas y particularmente, en los tractos respiratorio e intestinal. Existe además una pequeña cantidad de estas células inmunocompetentes distribuidas ampliamente en otros órganos del cuerpo.

En cuanto a la inmunorespuesta celular está condicionada por la presencia de linfocitos T, esquemáticamente podemos representar los dos tipos de respuesta en la figura 8, según BARASOAIN y cols (1977).

Han pasado ya muchos años desde que la aparición de anomalías tímicas frecuentes en niños con deficiencias inmunológicas, hiciera sospechar que el timo estuviera relacionado de alguna manera con el desarrollo de la respuesta inmune. Esta relación fue confirmada por la demostración de MILLER (1962) que efectuando la timectomía en ratones recién nacidos observó: a) disminución en el número de linfocitos circulantes con gran depresión en su capacidad para responder a muchos antígenos durante el resto de la vida; y b) ausencia del rechazo de transplante.

El papel regulador del timo en la inmunorespuesta se ha estudiado durante estos últimos años lográndose un avanzado estado de conocimientos; así, en los últimos 5 años se ha descubierto que desde la célula precursora de origen medular hasta la aparición del linfocito T antígeno-activado existen 6 fases de modulación linfocitaria diferenciadora, al término de las cuales aparecen los distintos tipos de linfocitos T, por ejemplo las células de la memoria, los efectores que dan lugar a linfoquinas o factores IgT (MILLER, 1975), etc. Esta diferenciación continúa a las células postímicas inmunocompetentes son los precursores de los linfocitos T inmunocompetentes (STUTMAN, 1975).

Respecto a las antes mencionadas linfoquinas, debemos señalar que según algunos autores, el interferón es uno de los mediadores solubles de la inmunidad celular detectado en cultivos

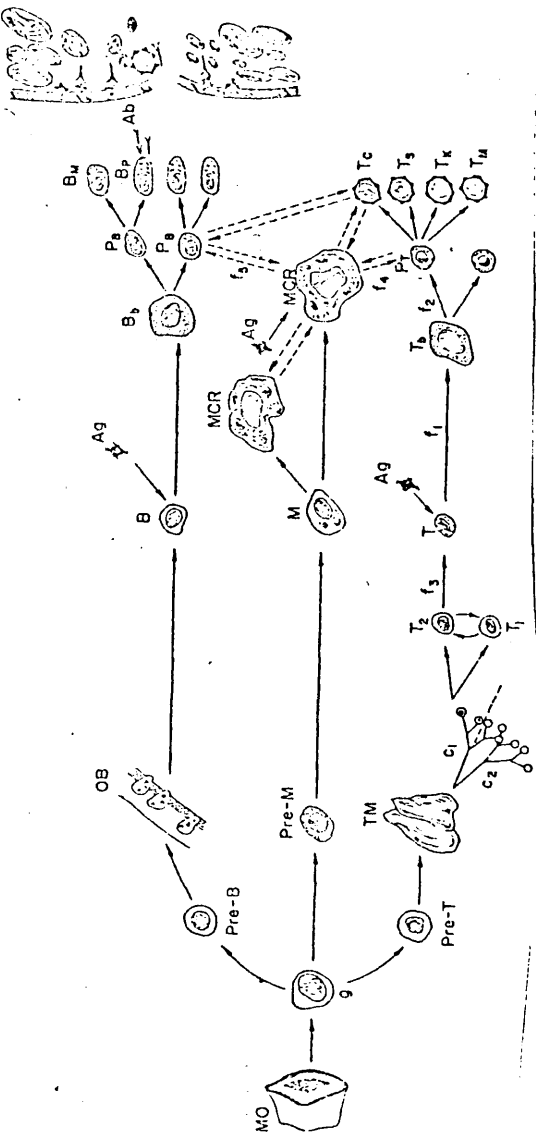


Fig. 8.- Relación entre los linfocitos B y T en la inmunorespuesta. MO: médula ósea; g: células germinales; Pre-B, Pre-T y Pre-M: distintas células precursoras; OB: Órgano bursal; TM: timo; C1: proliferación de células inmunocompetentes; C2: células autorreactivas a extinguir; T₁, T₂: linfocitos T inmaduros; T, B: linfocitos T y B inmunocompetentes respectivamente; M: monocitos; Ag: antígeno; MCR: macrófago; T_b, B_b: linfoblastos; PB, PT: proliferación de células blásticas; BM, TM: células de médula; T_c, T_s, T_k: linfocitos T cooperadores, supresores y citotóxicos respectivamente; B_p: célula plasmática; Ab: anticuerpos circulantes (BARASOAIN y cols. 1977).

de linfocitos tras ser activados por mitógenos o antígenos (DAVIS, 1971; GIFFORD y cols. 1971; GREEN y cols. 1969; STINEBRING y ABSHER, 1970, WHEELLOCK, 1965). Estos mediadores son denominados linfoquinas (DUMONDE y cols. 1969) o productos de activación de macrófagos (KELLY y cols. 1972) habiendo sido muy estudiados hasta el momento (LAWRENCE y LANDY, 1969; BLOOM y GLADE, 1971; BLOOM, 1971; DAVID, 1972; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1973).

Otras linfoquinas muy conocidas son: factor inhibidor de la migración (DAVID, 1972); linfotoxina (GRANGER y WILLIAMS, 1971); factores quimiotácticos para monocitos, granulocitos, eosinófilos y linfocitos (WARD y cols. 1970); factor activador de macrófagos (HAMMOND y DVORAK, 1972); factor mitogénico (DUMONDE y cols. 1969), etc. Todas estas linfoquinas parecen tener un papel regulador, junto con el interferón sobre diversas funciones, ejerciendo un control negativo o positivo (WAKSMAN y NANBA, 1976) que interaccionan entre si.

En este momento el interferón es la única linfoquina que puede ejercer control positivo y negativo sobre la respuesta inmune, así BRAUN y LEVY (1972) demostraron la capacidad variable del interferón para incrementar el número de células formadoras de anticuerpo en ratones cuando se les administraba entre 25 - 2.500 unidades de interferón. Cuando la dosis era de 5.000 a 10.000 unidades de interferón encontraron una inhibición de la síntesis de anticuerpo GISLER y cols. (1974) también estudiaron y observaron este efecto.

Los tiempos de aparición de estos mediadores varían, así el factor inhibidor de la migración y la linfotoxina son producidos pocas horas después de la estimulación antigénica no requiriendo la proliferación celular, otros aparecen posteriormente y requieren dicha proliferación (NAMBA y cols. 1977). El interferón puede aparecer muy precozmente o tarde poseyendo, por tanto, propiedades muy distintas (MAEHARA y HO, 1977) y dependiendo del protagonismo de los linfocitos T en el primer caso. Es importante tener en cuenta que aunque el interferón se encuentra junto con los otros mediadores en algunos de los sobrenadantes de los cultivos estimulados por antígeno o mitógeno, siempre se ha diferenciado de ellos por su menor peso molecular y su propiedad de especificidad de especie. Por otra parte, el interferón in vitro aparece mucho más tarde en los cultivos que el resto de los mediadores.

1.3. Depresión o supresión de la respuesta inmune

Según qué determinadas circunstancias el huésped puede no reaccionar inmunológicamente frente a una infección viral y de hecho está suficientemente demostrado que la acción de distintos agentes físicos, químicos o biológicos puede causar estados muy diversos de inmunosupresión; entre los agentes físicos recordaremos la radiación UV, dentro del grupo de fármacos alquilantes, unos pueden bloquear los procesos intracelulares de maduración del antígeno (POTEL, 1970, ZSCHJESCHE y AUGSTEN, 1970), otros, dependiendo de las circunstancias de formación de los anticuerpos específicos (IgG o IgM) pueden suplir éstos en mayor o menor grado, como sucede con algunos fármacos corticoides.

Asimismo hay que tener en cuenta que dentro de la fisiología de la inmunorespuesta, existen procesos reguladores y que con ellos se puede originar una supresión de los linfocitos B; así, cuando se mezclan linfocitos T de animales inmunotolerantes con linfocitos de animales normales, éstos ya no reaccionan adecuadamente porque disminuye la síntesis de IgG (McCULLAGH, 1970; GERSHON y KONDO, 1971).

Como una idea general del tema cabe señalar que la acción de distintos depresores o supresores puede interferir o alterar la respuesta inmune en distintos puntos de la misma:

- i) Evitando la formación de células inmunocompetentes a partir de las células precursoras de la médula ósea, por ablación quirúrgica o bloqueo de los órganos linfoides primarios.
- ii) Impidiendo que las células inmunocompetentes entre en contacto con el antígeno por destrucción de las mismas, por alteración de los centros reaccionantes inmuno-específicos, o por bloqueo de estos centros o del antígeno mediante anticuerpos preparados específicamente.
- iii) Bloqueando la función inmunoeffectora de los macrófagos por vía inespecífica con colorantes o sustancias inertes; mediante inactivación con sueros específicos, y por alteración de su función normal para el procesado antigénico mediante hormonas corticoesteroides.
- iv) Interrumpiendo los procesos de maduración, proliferación y diferenciación que sigue a la estimulación antigénica de las células inmunocompetentes, por la acción de antimetabolitos o por agentes antimitóticos.

- v) Interfiriendo específicamente con antibióticos la acción de otras sustancias dentro de los mecanismos de síntesis para la producción de inmunoglobulinas.

Desde nuestro punto de vista merecen una especial mención la inmunosupresión originada por ciertas infecciones virales, estas se producen por la presencia de complejos virus-anticuerpo-complemento como sucede con el virus del sarcoma de Moloney (OLDSTONE y DIXON, 1971), por una rápida reducción en el número de células B y T en el bazo como sucede con el virus de Rowson Parr (BENDINELLI y FRIEDMAN, 1976) o afectando la producción de las inmunoglobulinas G y M, caso del virus Friend (BENDINELLI y cols. 1979).

En ocasiones, y con propósitos clínicos, puede ser necesario producir una respuesta inmunosuprimida en el huésped. Dentro de todo tratamiento inmunosupresivo existen una serie de variables a tener en cuenta, puesto que condicionan el resultado final de tal inmunosupresión. Estas variables o condicionantes dependen tanto del fármaco o agente empleado, como de la especie animal sometida al tratamiento, como del tipo de inmunorespuesta que se quiere modificar; de aquí que haya que tener en cuenta los puntos siguientes:

- 1) Naturaleza del agente o sustancia, dosis y modo de aplicación.
- 2) Tiempo relativo entre la administración del antígeno y el fármaco o sustancia inmunosupresora.
- 3) Naturaleza e intensidad de la respuesta inmunológica que se estudia, así como la posible resistencia a la supresión manifestada por la fase inmunitaria que se desea bloquear.
- 4) Receptividad de cada especie animal al tratamiento inmunosupresor aplicado.

Según BEREMBAUM (1969) la consideración de estos cuatro puntos permite el diseño de esquemas terapéuticos de selección a la hora de usar agentes supresores de la respuesta inmune.

Dentro del estudio actual de las interacciones inmunitarias hay varios objetivos prácticos relacionados con la posibilidad de establecer estados de inmunosupresión controlada como por ejemplo en eritroblastosis fetal por incompatibilidad de factor Rh, en la inhibición de procesos tumorales, enfermedades autoinmunes, rechazo de injertos, eliminación de estados alérgicos e hipersensibles condicionados por el medio ambiente, etc. Dentro de estos y otros casos, la inmunosupresión juega un papel muy importante, así por ejemplo, en leucemias inducidas por virus, CEGLEWSKY y cols. 1968 a,b, 1971, 1975 observaron una depresión muy marcada de la respuesta inmune frente a antígenos no relacionados, teniendo lugar este fenómeno en una fase temprana de la enfermedad. Más recientemente en 1976, STUTMAN estudia y relaciona la oncogénesis con la supresión de la respuesta inmune.

2.- Relaciones entre interferón y respuesta inmunitaria

Actualmente se sabe que el interferón puede jugar un papel importante en la regulación de la respuesta de anticuerpos (JOHNSON y BARON, 1976 a) y uno de los aspectos mas interesantes de este estudio es el referente a la inmunosupresión. En este aspecto hay que tener en cuenta una serie de circunstancias biológicas como por ejemplo, que el interferón es un producto sintetizado y liberado por muchos tipos de células, entre ellas las inmunocompetentes y ello trae como consecuencia una influencia de distinto significado sobre la función linfocitaria. Así cabe distinguir entre un interferón "clásico" como respuesta a

una infección viral y un interferón "inmune" producido por linfocitos sensibilizados.

2.1. Células productoras de interferón inmune

En 1965, WHEELLOCK demostró que cultivos de leucocitos humanos estimulados con PHA, no sólo sufrían blastogénesis, sino también producían interferón. Comparado este interferón con el inducido por NDV en el mismo cultivo, el interferón PHA se pudo diferenciar por su inestabilidad a pH 2 y su actividad biológica a 56°C. Simultáneamente y con posterioridad se encontró una variedad de mitógenos como el "pokeweed" o la Con A (FRIEDMAN y COOPER, 1967, GREEN y cols. 1969; WALLEN y cols, 1973) e incluso lipopolisacáridos endotóxicos (HO, 1965) que conducían a esta producción de interferón inmune.

Por otra parte, también GLASGOW en 1966, demostró la inducción inmunespecífica de interferón por antígenos virales, encontrando que leucocitos de exudado peritoneal de animales inmunizados con arbovirus Chikungunya, producían cantidades de interferón 2 a 10 veces mayor cuando se exponían al virus homólogo respecto a las preparaciones similares de células procedentes de animales no inmunizados. La respuesta del leucocito inmune fue específica y sólo desencadenada por el virus citado. En consecuencia han quedado claramente definidos dos tipos de interferón, uno "clásico" inducido por virus y poliribonucleótidos en todo tipo de células (ISAACS, 1963; FIELD y cols. 1967) y otro "inmune" sintetizado, junto con otros mediadores, por estimulación antigénica de linfocitos sensibilizados (GREEN, 1969; SALVIN y cols. 1973) y por mitógenos de linfocitos T (WHEELLOCK, 1965; STOBO y cols, 1974; JOHNSON y cols. 1977).

Las propiedades del interferón inmunológicamente inducido difieren de las del interferón clásico en varios aspectos:

- i - El interferón inmune es inestable a pH 2.0 (WHEELOCK, 1965; YOUNGNER y SALVIN, 1973; VALLE y cols. 1975b).
- ii - La estabilidad al calor (56° C) varía según los investigadores, unos establecen que es lábil (WHEELOCK, 1965; VALLE y cols. 1975b) mientras que otros aseguran que es relativamente estable (YOUNGNER y SALVIN, 1973)
- iii- Ambos interferones presenta distinta antigenicidad. Así YOUNGNER y SALVIN (1973) y JOHNSON y BARON (1976) encontraron que el interferón clásico era neutralizado por anticuerpos preparados contra interferón de células L altamente purificados, mientras que el interferón inmune, no era neutralizado por dichos anticuerpos.
- iv - Tienen distintas propiedades biológicas; mientras el interferón clásico de ratón, inhibe la replicación de VSV en cultivos celulares de riñón de cobaya (YOUNGNER y SALVIN, 1973), el interferón inmune no presenta ninguna actividad en este sentido.

YOUNGNER y SALVIN (1973) definen el interferón clásico como tipo I y el interferón inmune como tipo II; y también sugieren que, en determinadas especies animales, puede haber una variedad de moléculas de proteína con actividad de interferón y que la variación en los tipos de interferón puede ser tan grande como las variedades moleculares de anticuerpos.

En cuanto a interacciones celulares relacionadas con la aparición del interferón II, EPSTEIN y cols (1970 y 1971 b) demostraron que los linfocitos humanos constituían una buena fuente de interferón y de aquí derivaron estudios sobre el papel

desempeñado por los macrófagos en la síntesis de esta sustancia, comprobándose que la presencia de los mismos, aún no siendo imprescindible, hacía mas abundante dicha síntesis. VALLE y cols. (1975a) purificaron linfocitos humanos obteniendo cultivos con un rendimiento de linfocitos T del 95% o más; cuando estimularon estos cultivos con mitógenos o antígenos inmunoespecíficos se produjo interferón. En series paralelas se trataron linfocitos con suero anti-T más complemento para diferenciar la naturaleza de las células que habían respondido a la síntesis de interferón. La incubación posterior de estos linfocitos así tratados en presencia de PHA o T producían poco interferón si es que aparecía algo indicando que las células T eran indispensables en la producción de este interferón.

El conjunto de observaciones de EPSTEIN y AMMANN (1974) efectuadas con linfocitos T procedentes de pacientes con inmunodeficiencias selectivas, que respondían normalmente a la PHA pero producían poco interferón, concluyeron en la existencia de diferentes subpoblaciones de linfocitos T implicadas en la blastogénesis y posterior producción de interferón. WALLEN y cols. (1973) también investigaron la naturaleza de las células productoras de interferón y para ello emplearon esplenocitos murinos estimulados con mitógenos o antígenos específicos; así comprobaron que la fracción de células productoras de interferón pertenecía a una población celular diferente de aquellas que sintetizaban DNA y también comprobaron la necesidad de la presencia de un tipo de células T para producir interferón.

Por otra parte EPSTEIN y cols (1974), en su estudio para identificar células productoras de interferón, prepararon poblaciones puras de linfocitos T humanos y poblaciones enriquecidas de células B. Encontraron que en presencia de macró-

fagos, ambas células T y B, producían interferón en respuesta a los mitógenos PHA y "pokeweed". Sin embargo, en el caso de emplear las células T aisladas el interferón se detectaba en el cultivo a los tres días mientras que con cultivos de células B aparecía a los 5 - 7 días; esto parece indicar que la producción de interferón puede utilizarse como medida de competencia de linfocitos T, igual que la producción de anticuerpos es tomada como medida de inmunocompetencia para linfocitos B. En algunos casos, el título de interferón producido por las células B llega a ser igual al producido por los linfocitos T. EPSTEIN y cols. (1971 a, 1971 b, 1974) también demostraron que eran necesarias interacciones entre distintos tipos celulares para la producción máxima de interferón, encontrando que la cantidad de interferón producida por linfocitos estimulados por PHA aparecía aumentada en cinco veces cuando estaban presentes los macrófagos.

La adición de macrófagos a linfocitos en cultivo también aumentan la producción de interferón, en el caso de una respuesta inmune específica a PPD, vacuna y virus herpes simplex (EPSTEIN y cols., 1972; RASMUSSEN y cols., 1974; EPSTEIN y cols. 1971 a); observándose que mientras que cultivos puros de linfocitos (99,5%) producían bajos niveles de interferón en respuesta a PHA, los cultivos puros de macrófagos (96-100%) eran incapaces de producir interferón, la existencia de cultivos mixtos de linfocitos y macrófagos proporcionaba elevados niveles de interferón.

2.2. Efecto del interferón sobre el sistema inmunitario "in vitro e "in vivo".

No ha sido fácil la puesta a punto de métodos para conocer los efectos del interferón sobre el sistema inmunitario ya que por una parte, los estudios "in vivo" precisan grandes cantidades de interferón y por otra, se conoce poco la cinética

del interferón administrado en el microambiente de la célula inmunocompetente, por último también dificulta estos estudios el hecho de que el interferón sufra una rápida eliminación en el organismo (CANTELL y PYHALA, 1973, CANTELL y cols. 1974 a; EMÓDI y cols. 1975). Pese a todo, los estudios llevados a cabo han demostrado que el interferón puede producir una supresión de la respuesta de anticuerpos tanto "in vivo" (BRAUN y LEVY, 1972; BRODEUR y MERIGAN, 1974; CHESTER y cols. 1973), como "in vitro" (GISLER y cols. 1974; JOHNSON y cols. 1975 a, b; BOOTH y cols. 1976 a) cuando se administra previa o conjuntamente al antígeno inmunizante y tiene un papel importante en la inmunoregulación. Así, PAUCKER y cols. (1962) y posteriormente GRESSER y cols. (1970, 1973) encontraron que preparaciones que contenían interferón llegaban a producir la supresión del crecimiento de células tumorales (células L de ratón) y en ellas no era posible separar la actividad sobre las células de la actividad antiviral.

En una serie de estudios "in vitro", GISLER y cols. (1974) encontraron que se requerían 3.000 unidades interferón inducido en células L/ml para suprimir significativamente la respuesta de células formadoras de placas en esplenocitos de ratón BALB/c tras la inmunización con SRBC. Este efecto se observó cuando los cultivos se sometieron a un tratamiento previo con interferón durante 6 horas antes de la inmunización, o bien, 40 horas después de la inmunización.

Empleando poblaciones celulares individualizadas, se vio que el interferón actuaba directamente sobre los linfocitos B y no tenía efectos sobre los macrófagos y linfocitos cooperadores. Cuando el estudio se efectuó con poblaciones celulares conjuntas de linfocitos B, T y macrófagos, se observó también

que el interferón actuaba sobre los linfocitos B, no inhibiendo las funciones de los otros tipos celulares presentes en el cultivo (GISLER y cols. 1974). También JOHNSON y cols. (1974, 1975 d) observaron que de 20 a 60 unidades de interferón viral, procedentes de distintas fuentes, podían inhibir en un 90% la respuesta de PFC in vitro en esplenocitos de ratón C57B1/6 y que con dosis equivalentes a 40 unidades o más, de interferón crudo procedente de células L, se obtenía la mayor inhibición de la respuesta de PFC correspondiente a más del 99%. Aunque las preparaciones de interferón mencionadas poseían potencias distintas así como diferentes actividades específicas, fueron capaces de inhibir la respuesta de PFC proporcionalmente a sus actividades antivirales y además, tanto la actividad antiviral como la inhibidora de PFC de los interferones fueron neutralizadas por anticuerpos específicos para interferón murino. Ambas actividades eran parcial o totalmente inactivadas por el calor a 60° C durante 1 hora. Los interferones humanos, a las concentraciones empleadas, no tenían actividad antiviral ni inhibidora de PFC en células de ratón.

Una exposición limitada de células (4 horas) a los interferones inhibe significativamente tanto la infección viral como la respuesta de PFC. Ambas actividades de las preparaciones de interferón, tanto antiviral como inhibidora, fueron ácido estables.

En conclusión parece justo afirmar que la inhibición de la respuesta primaria de PFC "in vivo" fue debida al interferón existente en las preparaciones (JOHNSON y cols. 1975 d) encontrándose que 40 unidades interferón suprimían en un 99% el número de células formadoras de anticuerpo en ratón. El efecto

máximo se observó cuando el interferón era añadido al mismo tiempo que los SRBC, pero la inhibición significativa se produjo cuando el interferón se añadió 24 horas después de la inmunización.

Estos mismos autores (JOHNSON y cols. 1975d) estudiando células de bazo de ratones "desnudos" (atímicos) y de muestras de bazo exentas de macrófagos, observaron que no se requería la presencia de los linfocitos T y macrófagos para que el interferón ejerza su efecto inhibitor sobre los linfocitos B, aunque reconocen la casi imposibilidad de separar completamente los macrófagos de los cultivos, no niegan la posibilidad de que los macrófagos residuales jueguen un posible papel.

Recientemente se ha aclarado la naturaleza de los acontecimientos celulares de la inhibición de la respuesta "in vitro" de PFC por el interferón (BOOTH y cols. 1976 a, b). Los estudios llevados a cabo sugieren que este interferón afecta sólo a los precursores no activados de células B, evitando que lleguen a activarse. Las células precursoras menos diferenciadas son más susceptibles a la inhibición por interferón que las más diferenciadas y las células precursoras, que responden más tempranamente, son refractarias a la supresión de la respuesta inmune inducida por el interferón. La inhibición mencionada envuelve una relación dinámica entre la naturaleza del antígeno, la concentración de interferón añadido a los cultivos celulares estimulados por el antígeno y el tiempo de administración del interferón respecto al antígeno (JOHNSON y BARON 1976 b). La respuesta de PFC a un antígeno timo-dependiente, como son las SRBC, es suprimida más fácilmente que la de un antígeno timo-independiente como el LPS 0127 de E. coli

En cuanto a los estudios "in vivo" sobre inmunosupresión inducida por interferón, CHESTER y cols. (1973) administraron a ratones concentraciones altas de interferón viral ($1,8 \times 10^5$ unidades) por vía intravenosa, dos días antes de la inmunización y encontraron una disminución del 84% en el número de esplenocitos de bazo capaces de formar anticuerpos frente a los SRBC. Dosis de interferón humano comparables a las de interferón murino que habían producido inmunosupresión en ratones, no tuvieron efecto sobre la respuesta PFC de esplenocitos murinos; este hecho indica que la especificidad filogenética del efecto antiviral del interferón también se extiende al efecto inhibidor de las PFC "in vivo".

Se ha observado que la capacidad del interferón inducido por virus para inhibir la respuesta de anticuerpos estaba relacionada con la dosis de antígeno (BRODEUR y MERIGAN, 1974). La respuesta de anticuerpos en los ratones, frente a 1×10^7 SRBC por ejemplo, resultaba inhibida significativamente frente a $1,5 \times 10^5$ unidades de interferón. Ambas respuestas primaria y secundaria, así como la síntesis de IgM e IgG quedaban afectadas por el tratamiento con el interferón.

En cuanto a otras respuestas de la célula inmunocompetente también se ha comprobado que sufren una supresión debida al interferón. Cuando se descubrió que el interferón inhibía la síntesis de DNA en linfocitos estimulados por PHA o por células alogénicas (LINDAHL MAGNUSSON y cols. 1972) podía haberse supuesto que el efecto inhibidor del interferón sobre la respuesta inmune celular podía ser explicado por una inhibición en la multiplicación de linfocitos; pero sin embargo en los sistemas de cultivo celular estudiados, se comprobó mas tarde que las células tratadas con interferón se dividían hasta varias

veces. Por el contrario, CEROTTINI y cols. (1973), administrando interferón murino parenteralmente, observaron una inhibición de la multiplicación de células de bazo transplantadas procedentes de ratones alogénicos y una marcada depresión en la capacidad lítica de los linfocitos T. Asimismo DE MAEYER y cols. (1975) observaron la inhibición de la respuesta hipersensible retardada a SRBC y NDV en ratones.

Otro aspecto muy interesante de la actividad del interferón en la inmunosupresión es su capacidad para activar macrófagos. HUANG y cols (1971) y JAHIEL y cols (1968) demuestran que administrando inductores de interferón se logra la desaparición de cuadros de malaria experimental en ratones. Mas recientemente (HUANG y DONAHOE, 1975) ponen de manifiesto que inoculando interferón exógeno en ratones aparece un incremento de la capacidad fagocitaria de los macrófagos tanto "in vivo" como "in vitro". El interés despertado por este estudio ha desembocado en un conjunto de experimentos "in vivo" e "in vitro" que ha demostrado que, bajo ciertas condiciones, el interferón puede ejercer un pequeño efecto de aumento de la respuesta en anticuerpos además de sus efectos inmunosupresores. Así, interferón murino administrado a ratones o añadido a cultivos de esplenocitos 2 ó 3 días después del antígeno han mostrado un ligero aumento de la respuesta anticuerpo (BRODEUR y MERIGAN, 1975; JOHNSON, 1975 d). Y, por otra parte, mediante administración de interferón se han elevado hasta niveles óptimos algunas respuestas inmunes subóptimas obtenidas "in vitro" (GISLER y cols, 1974) así se ha encontrado un ligero aumento en la inmunorespuesta a ratones tras administración de concentraciones bajas de interferón inducido viralmente (BRAUN y LEVY, 1972). Es lógico suponer que esta inmunoestimulación subsiguiente a la inmunosupresión está condicionada a la intervención de los macrófagos.

Muy recientemente se han realizado estudios comparativos sobre las propiedades antiviral e inmunosupresora "in vitro" del interferón inducido viralmente y el inducido por mitógenos (JOHNSON, 1978). Así se ha visto que la supresión de la respuesta de anticuerpos "in vitro", debida al interferón viral, puede quedar bloqueada por el 2-mercaptoetanol (m.e.) 5×10^{-5} M; este bloqueo tenía lugar cuando el 2-mercaptoetanol se añadía a los cultivos celulares 48 horas después de la administración del interferón. Según parece, el 2-m.e. bloquea selectivamente los efectos inmunosupresores del interferón inducido viralmente y de sus inductores, mientras que no tiene efecto alguno sobre la supresión ocasionada por inductores de interferón inmune. Como el 2-m.e. no actúa sobre las propiedades antivirales de ambos tipos de interferón, los datos proporcionados por este estudio constituyen la primera demostración de una diferencia a establecer de las propiedades biológicas de ambos interferones, según sean inducidos por virus o por mitógenos.

El hecho de que los linfocitos T puedan producir interferón y de que el interferón pueda inhibir ambas funciones T y B apuntan hacia la posibilidad de que el interferón pueda tener un papel regulador en la inmunorespuesta (JOHNSON y cols. 1975 d; GISLER y cols. 1974; BRODEUR y MERIGAN, 1974, 1975). Así, en efecto, se ha sugerido que la conocida acción supresora sobre las células T puede ser mediada, en parte, por el interferón (JOHNSON y cols, 1975 d; BRODEUR y MERIGAN, 1975), aunque aún no está claro el mecanismo preciso por el cual el interferón afecta al sistema inmune. En este sentido se han propuesto distintas posibilidades, tales como inhibición de la división de las células precursoras desencadenada por el antígeno, efectos sobre la membrana celular y alteraciones en la interacción o cooperación de células B y T (GISLER, y cols. 1974)

2.3. Papel del interferón tipo II en la inmunorespuesta

Aunque los interferones difieren en varias propiedades físicas y antigénicas, ya se ha estudiado en el capítulo correspondiente que la expresión antiviral de ambos tipos de interferón aparece siempre regulada por el mismo locus genético, que se localiza en el segmento distal del brazo largo del cromosoma 21; ello hizo suponer que el interferón inmune tendría efectos similares a los del interferón clásico sobre la respuesta inmune, lo que ha sido confirmado por trabajos recientes. Así HEINE y ADLER (1977a), estudiando esplenocitos murinos de las razas C57BL/6 y CBA, demostraron que la producción de interferón estimulada por la succinil-Con A incrementa con la edad de la célula donante y varía considerablemente con la raza donante estudiada. La cantidad de interferón liberada por células de ratones mayores de 6 meses fue suficiente para ejercer un patente efecto supresor, según fue comprobado por métodos aplicados para determinar la activación y proliferación linfocitaria: a) por ensayo de células formadoras de placas producidas por virus; y b) por técnicas basadas en la incorporación de ^3H -timidina al DNA (HEINE y ADLER, 1977 b).

Es sabido que la activación y proliferación de células T de ratón declina con la edad del animal. Dado por una parte el aumento de producción de interferón según aumenta la edad del donante y por otra, la observación de que el interferón tipo I exógeno puede inhibir la proliferación linfocitaria en respuesta a mitógenos y células alogeneicas (LINDHAL-MAGNUSSON y cols. 1972; PACHECO y cols. 1976; ROZEE y cols. 1973; WALLEN y cols. 1975) es bastante razonable aceptar que el interferón producido endógenamente como una parte de la respuesta inmune también posea un efecto regulador similar sobre la proliferación de linfocitos.

El interferón tipo II puede afectar la respuesta inmuno-humoral. SONNENFELD y cols. (1977) observaron que los efectos inmunomoduladores del interferón II, contenido en suero de ratones sensibilizados con Mycobacterium bovis cepa BCG e inoculado con tuberculina antigua, eran dependientes del tiempo y dosis de administración. El material utilizado era lábil a pH 2 pero estable a 56° C y ejercía un efecto supresor sobre la respuesta primaria de anticuerpos frente a SRBC "in vitro" si se añadía antes de la inmunización, pero ejerciendo un efecto de aumento sobre la respuesta cuando se añadía después de la inmunización.

Este efecto supresor del interferón inmune sobre la respuesta humoral ha sido estudiado también por BRODEUR y cols. (1977), quienes pasando poblaciones de esplenocitos murinos a través de una columna que contenía conjugados insolubilizados de histamina encontraron que la capacidad de las células quedaba disminuida para producir interferón en respuesta a mitógenos, pero aumentaba su capacidad para sintetizar anticuerpos frente a SRBC. Estos investigadores, a la vista de estos resultados, consideraban como posible explicación que la columna retiene una subpoblación de linfocitos T que suprimen la respuesta inmune a través de la producción de interferón.

2.4. Intervención de los inductores de interferón en la interacción interferón-células inmunocompetentes.

En nuestro propósito de revisar cuanta bibliografía pueda sernos útil para considerar nuestros propios resultados en relación con la síntesis y propiedades inmunobiológicas del interferón parece lógico dedicar un apartado al papel representado por los inductores de interferón en el sistema biológico de ensayo; máxime cuando en nuestro propio laboratorio tenemos datos de que la respuesta inmune o de interferón puede variar en función de ciertos parámetros que afectan a la inducción

(RONDA y cols, 1976) o al empleo de inmunoestimulantes o inmunosupresores (BARASOAIN y cols. 1978).

2.4.1. Los inductores de interferón

En contraste con la actividad supresora general de los interferones, se ha encontrado que distintos inductores de interferón tienen efectos tanto supresores como exaltadores de la respuesta anticuerpo "in vivo" e "in vitro", dependiendo de una serie de circunstancias experimentales. Así, los poliribonucleótidos sintéticos de doble cadena generalmente exaltan la respuesta inmune en ratones, cuando se administran simultáneamente con antígenos, pero cuando los animales lo reciben 12 - 48 horas antes de la inoculación del antígeno dan lugar a un profundo efecto supresor sobre la producción de anticuerpo (JOHNSON y cols. 1975 c, d); esto se ha observado con ratones inyectados intravenosamente con poli A : U a tiempos variables respecto a la inyección intravenosa de γ -globulina bovina (SCHMIDTKE y JOHNSON, 1971) También, en pruebas realizadas "in vitro" sobre cultivos de esplenocitos se añadió poli A:U y poli I:C, a concentraciones de 0,1 - 1,0 μ g/ml que inhibieron la respuesta de PFC anti-SRBC en más del 90% cuando estos poliribonucleótidos eran añadidos a los cultivos sólo con antígeno (JOHNSON y cols. 1975 c). Estos autores también comprobaron que era necesaria la presencia de linfocitos T funcionales en los cultivos para que los polirribonucleótidos fueran efectivos como inhibidores, demostrándose así la dependencia timo-inhibición.

Los resultados obtenidos por JOHNSON y cols. (1976b) mostraban que el efecto inhibidor de poli A:U sobre la respuesta de PFC "in vitro", quedaba neutralizado por anticuerpos frente al interferón viral y el mismo efecto se observó con el anti-

geno LPS 0127 de E. coli. Por otra parte, la propiedad antiviral del interferón inducido en cultivos de esplenocitos por poliribonucleótidos quedaba también neutralizada por el mismo anticuerpo al interferón. Estos descubrimientos sugieren que el efecto inmunosupresor "in vivo" de los poliribonucleótidos de doble cadena es debido a una estimulación temprana de la producción de interferón por linfocitos T.

Se ha demostrado que varios mitógenos para linfocitos T (Con A, PHA y enterotoxina A estafilocócica) estimulan la producción de interferón sólo en cultivos de células linfoides (JOHNSON y cols. 1975 a, 1977) mientras que suprimen la respuesta de anticuerpos en ratones, tanto "in vivo" (MARKOWITZ y cols. 1969; BARTH y SINGLA, 1973; EGAN y cols. 1974) como "in vitro" (DUTTON, 1972; RICH y PIERCE, 1973; WATSON y cols. 1973; SMITH y JOHNSON, 1975). Sin embargo, en conejos, se ha encontrado exaltación de la respuesta de PFC cuando se les administraba conjuntamente mitógeno y antígeno (ROMBALL y WEIGLW, 1975).

El mitógeno enterotoxina A estafilocócica, que resulta ser mejor inductor de interferón que la Con A o PHA, es significativamente más efectiva en cuanto a la inhibición de respuesta inmune que los otros mitógenos citados (JOHNSON y cols. 1977). La capacidad de los mitógenos celulares T para inhibir la respuesta de PFC en esplenocitos de ratón "in vitro" está, por tanto, relacionada con su capacidad para estimular los cultivos e inducir la formación de interferón.

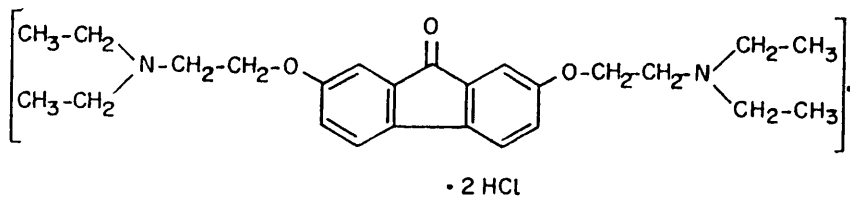
2.4.2. La tilorona como inductor de interferón

La administración de inductores de interferón para estimular la producción de interferón endógeno así como para incrementar la resistencia antiviral, ocurre cada vez con mayor

frecuencia, no habiéndose encontrado hasta el momento un inductor no tóxico que sea efectivo para uso humano. El descubrimiento de que ciertos inductores, por ejemplo la tilorona, podían inducir la formación de interferón circulante tras su administración oral estimuló el interés hacia el estudio de esta sustancia y otras moléculas de efectos similares.

Fueron KRUEGER y MAEYER (1970) quienes descubrieron que la tilorona, sustancia activa de bajo peso molecular (412 d) era capaz de inducir interferón cuando se administraba oralmente y por tanto de inducir resistencia contra varias infecciones virales. Con ella, por ejemplo, se protegió a ratones contra la infección de distintos virus DNA y RNA y a ratas contra el carcinoma de Walker y sarcoma reticular-celular (ADAMSON, 1971 a, b). Se ha comprobado que existe una relación directa entre dosis de tilorona administrada, título de interferón circulante y supervivencia de ratones infectados con VSV (MAEYER y KRUEGER, 1970; DE CLERCQ y MERIGAN, 1971).

La tilorona es el prototipo de inductores de interferón de bajo P_m ; es un compuesto tricíclico cuya fórmula se indica a continuación:



Bis(diethyl amino-2-etoxi)-2,7 fluorenona, diclorhidrato

Sobre esta molécula se pueden obtener derivados fluorados, portadores de una cadena lateral de dialkilamino-alkil, que también pueden inducir resistencia antiviral e interferón (ALBRECHT y cols. 1974; HO y ARMSTRONG, 1975).

Entre los efectos producidos por la tilorona se observó que era capaz de aumentar la respuesta de anticuerpos (IgG, M y E) frente a varios tipos de antígeno (HOFFMAN y cols. 1972; MEGEL y cols. 1974; DIAMANSTEIN, 1973), mientras que por otra parte deprimía la respuesta inmuno-celular asociada a los linfocitos T ya que ocasionaba una marcada linfopenia transitoria con disminución de linfocitos en las áreas T - celulares de bazo, nódulo linfoide y corpúsculos de Peyer (ZBINDEN y EMCH, 1972; LEVINE y cols. 1974). Estos resultados sugieren que la tilorona actúa selectivamente sobre las células T, no estando claro el mecanismo por el cual la tilorona ejerce un efecto estimulador sobre la respuesta de anticuerpos.

Se ha visto que la actividad antiviral del suero inducida por la tilorona en ratones, es debida a la producción de interferón (MAYER y KRUEGER, 1970; STRINGFELLOW y GLASGOW, 1972; DE CLERCQ y MERIGAN, 1971) y la aparición de esta actividad antiviral tiene lugar más o menos simultáneamente con la disminución de los linfocitos T con un efecto máximo que aparece a las 24 horas.

Asimismo se ha observado que la tilorona también es efectiva cuando se administra por otras vías distintas de la oral. En efecto una dosis comprendida entre 5 y 500 mg/kg de peso vivo, administrada oralmente, proporcionó títulos relativamente altos de inmunorrespuesta lo mismo que cuando se adminis-

tró intraperitonealmente. En ratones, dosis más bajas de tilorona (por ejemplo 25 mg/kg de peso vivo) son capaces de producir títulos circulantes detectables de interferón aunque resultan más tóxicas (DE CLERCQ y MERIGAN, 1971).

De todos los compuestos o inductores de interferón estudiados sólo tres se han aplicado al hombre: la tilorona (KRUEGER y MAYER, 1970), la diamina lipoidal CP - 20,961 (HOFFMAN y cols. 1973) y el poli I:C ya citado; de ellos se ha estudiado su actividad como inductores de interferón así como sus efectos clínicos.

La tilorona, a las dosis estudiadas (1000 - 15.000 mg/día) no ha mostrado actividad en el hombre en cuanto a inducción de interferón circulante. SCHIFF y cols. (1973) observaron un resultado positivo cuando administraron a cuatro individuos una dosis oral única de 750 mg antes de la administración intranasal de virus rubella; en estas condiciones la tilorona disminuyó la intensidad de la enfermedad diseminando el virus. En un principio se pensó que la tilorona no inducía interferón en líneas celulares (DE CLERCQ y MERIGAN, 1971; STRINGFELLOW y GLASGOW, 1972), sin embargo, DENNIS y cols. (1972) encontraron interferón en suspensiones de linfocitos humanos que habían estado en presencia de tilorona. Posteriormente, GROELKE y cols. (1975), observaron que en cultivos de células L 929 aumentaba la producción de interferón cuando estaba presente la tilorona junto con el poli I:C/DEAE-dextrano. Por otra parte, cultivos de fibroblastos de embrión de ratón en presencia de tilorona, produjeron una sustancia antiviral presente en el sobrenadante celular, que tenía las propiedades características del interferón.

Estudios toxicológicos han demostrado que la tilorona produce una serie de alteraciones en los sistemas hematopoyético y reticuloendotelial que se caracteriza por aparición de vacuolas, gránulos basófilos o de ambos, en los glóbulos blancos y macrófagos de hígado, bazo y nódulos linfoides de ratón, rata, perro y mono, dependiendo la intensidad de los efectos de la especie animal citada, de la dosis y del tiempo de administración (ROHOOSKY y cols. 1970).

La tilorona puede resultar incapaz de inducir interferón en algunas otras especies animales, pues no se han encontrado resultados positivos después de su administración oral en conejos y cerdos (ZINOBER y PIRTLE, 1971) ni tampoco en aplicaciones tópicas y orales en el hombre (KAUFMAN y cols. 1971).

2.4.3. *La ciclofosfamida como sustancia inmunosupresora.*

La ciclofosfamida es un potente agente alquilante linfoцитотóxico muy empleado como fármaco antineoplástico (AISENBERG, 1967; LERMAN y WEIDANZ, 1970, LINNA y cols. 1972). Tiene un fuerte efecto supresor sobre la formación de anticuerpos y síntesis de inmunoglobulinas en animales tratados (SANTOS y OWENS, 1966) destruyendo células supresoras B (KATZ y cols. 1974b) o T (DEBRE y cols. 1976; MITSUOKA y cols. 1976).

Pollos tratados con ciclofosfamida, durante el primer periodo de incubación, no respondieron a estimulación antigénica posterior y sufrieron una gran hipogammaglobulinemia. La implantación de células procedentes de la bolsa de Fabricio de pollos jóvenes en pollos tratados con ciclofosfamida es capaz de restaurar su sistema inmuno-humoral alterado por el trata-

miento ciclofosfamídico, tanto en su morfología como en su función (TOIVANEN y cols. 1972).

El uso de la ciclofosfamida, cuando se compara con otros agentes capaces de causar los mismos efectos, ofrece una serie de ventajas sobre el resto; así, es fácilmente administrable en dosis medibles y no requiere ni técnicas ni instrumentación especiales; el tratamiento, por otra parte, puede ser efectuado en un periodo corto de tiempo.

Se ha observado que tras una inyección intraperitoneal única de 300 mg/kg de peso vivo de ciclofosfamida a ratones C_3H/He , aparece una disminución en el número de esplenocitos a partir de los 2 ó 3 días de la administración seguido de una fase de regeneración que lleva a la recuperación de un nivel normal a los 8 - 10 días. KOLB y cols. (1977) hicieron un análisis del contenido en bazo de células B y T en ratones tratados con ciclofosfamida, comprobando una pérdida de reactividad de las células frente a mitógenos de células B y T.

Estos autores comprobaron la aparición temprana de una disminución en cuanto a la reactividad frente a LPS, mitógeno específico para células B, que estaba de acuerdo con los exámenes histológicos en los que se apreciaba una destrucción de los folículos (áreas B-dependientes) que precede a la de las vainas periarteriolares (áreas T-dependientes), presentando en etapas posteriores el mismo grado de destrucción.

Resultados posteriores sugieren que el tratamiento ciclofosfamídico conduce a una eliminación selectiva de una célula supresora de origen T envuelta en la regulación de la

respuesta de anticuerpos IgM "in vitro". Recientemente, ASHERSON y ZEMBALA (1978) observaron que los ratones tratados con ciclofosfamida no desarrollaban las células T que deprimen la síntesis de DNA e interpretan que los precursores de estas células T supresoras son sensibles a la ciclofosfamida. Este hecho puede referirse a un precursor de la propia célula, o a una célula cooperadora necesaria para su producción, o incluso a una célula intermediaria que sea necesaria para llevar a cabo su acción supresora.

Se ha observado, sin embargo, que en algunas circunstancias, las drogas inmunosupresoras pueden provocar una ligera exaltación de la respuesta inmune. Este efecto se atribuye a la eliminación selectiva de una célula supresora de vida corta por la acción de la droga. Se ha postulado que ésta pueda ser una célula B (LAGRANGE y cols. 1974; KATZ y cols. 1974a) por la preferente eliminación de células B de órganos linfoides en los animales tratados (TURK y POULTER, 1972). Otros autores como ASKENASE y cols. (1975) se inclinan a pensar que la célula supresora es de origen T.

2.5. Hipótesis sobre la acción inmunosupresora del interferón

DUTTON y cols. (1971) proponen un modelo para la función de las células T cooperadoras que puede ser útil a la hora de explicar los efectos supresores del interferón inmune en el ratón y que hasta este momento no encontramos ninguna otra investigación o dato que invalide esta hipótesis. (Fig. 9).

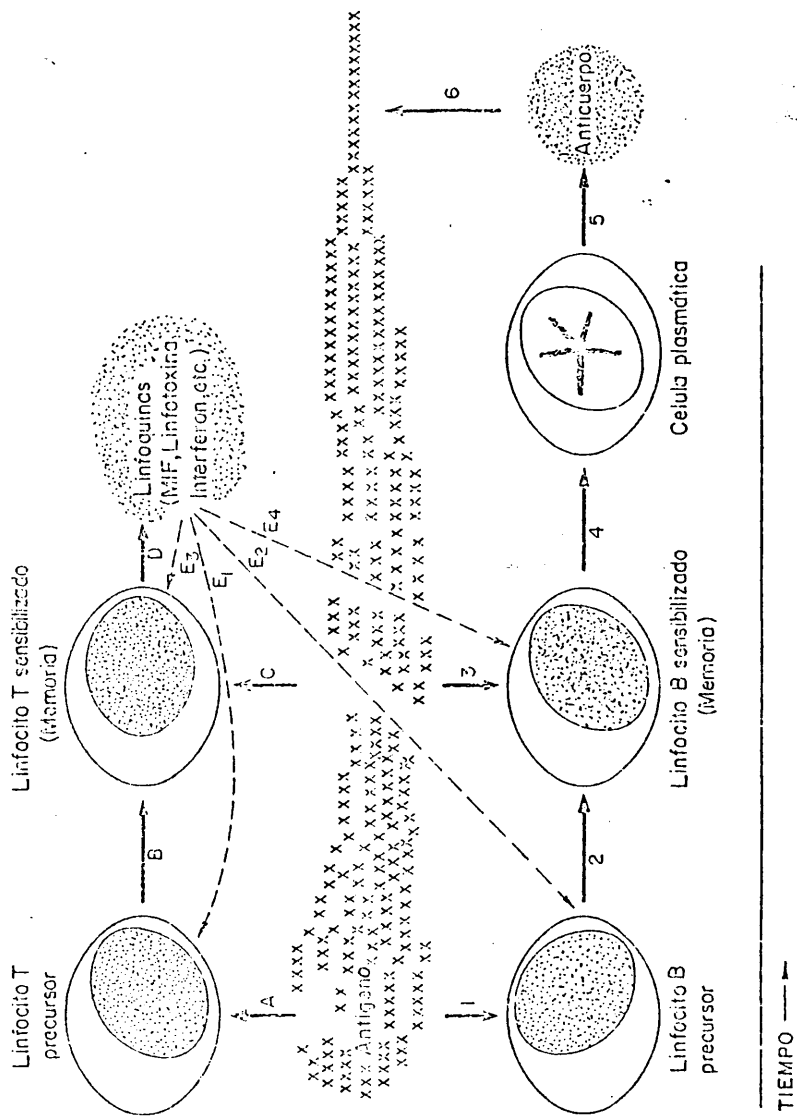


Fig. 9. Acontecimientos celulares en la inducción de interferón y de su acción inmunosupresora.

El antígeno entra en contacto con un precursor del linfocito T (A) que se transformará en linfocito T sensibilizado (B). Esta célula en presencia del antígeno (C) puede convertirse en una célula de memoria o puede liberar mediadores o linfoquinas (D). Entre estos mediadores producidos por el linfocito T está el interferón inmune. Por otra parte, el antígeno también reacciona con un precursor del linfocito B (1), que sufre la transformación linfocitaria y se convierte en un linfocito B sensibilizado (y en células de memoria) (2). La célula B sensibilizada en presencia de antígeno (3) se convierte en una célula plasmática (4) que es responsable de la producción de anticuerpo (5). El anticuerpo entonces reacciona con el antígeno específico (6). Tanto el interferón inducido por virus como el antigénico son capaces de reaccionar con los linfocitos precursores T (E_1) y T (E_2) así como con los linfocitos sensibilizados T (E_3) y B (E_4). Cuando la diferenciación continúa, como resultado de la presencia constante de antígeno, se hace cada vez más difícil la inhibición del linfocito por el interferón. Aunque en el esquema no quedan representados los macrófagos, estos interferones pueden ejercer su efecto inmunosupresor a través de la función de los macrófagos en la respuesta inmune.

Este modelo está basado por tanto en el hecho de que la célula B recibe una señal, de la célula T estimulada antigénicamente, en la forma de un mediador químico que no es antígeno específico. La efectividad de tal mediador depende de la proximidad entre la célula T y B. La especificidad de la reacción está regulada por la especificidad del receptor antigénico de las células T y B.

El modelo sugiere que la presencia de un receptor para el antígeno tanto sobre la célula B como en la célula T llegaría a estas células, cuando estén en estrecha proximidad, a ligarse con un mismo antígeno, en cuyo momento, el mediador, tras liberarse de la célula T, queda en el micro-medio de la célula B en concentración suficiente para ejercer su efecto. Esto puede ser aplicado para explicar como los mediadores inducidos antigénicamente (entre ellos el interferón) pueden ejercer sus efectos supresores. Suponiendo interacciones similares de células T, B y antígeno, la sustancia supresora puede ser liberada, de la célula T estimulada, en el microambiente de la célula B e inhibir la respuesta anticuerpo de la célula B al mismo antígeno.

FINTER (1973) observa que el modelo debe modificarse a la hora de explicar cómo interaccionan las células en los mecanismos de supresión por interferón inducido por virus, teniendo en cuenta que este interferón es sintetizado por cada una de las células presentes en el cuerpo. Por otra parte, aquellos virus cuya infectividad está íntimamente asociada al tejido linfóide pueden tener, en general, un efecto supresor mayor sobre la respuesta inmune que aquellos no asociados con el tejido linfóide (VIRELIZIER y cols. 1976).

V. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Como puede verse, por cuanto antecede, en poco más de dos décadas que hace que fuera descubierto el interferón se ha avanzado lo suficiente en el conocimiento de los mecanismos bioquímicos de biosíntesis, pero se está todavía lejos de poder alcanzar la aplicación en terapéutica antiviral, tan deseada por todos. Muy recientemente hemos tenido noticia de un medicamento ruso a base de una preparación de interferón impuro que se aplica en el tratamiento en cuadros localizados (preferentemente herpes) o generalizados (gripe o infecciones por rinovirus) de etiología vírica y cuyos resultados no aparecen totalmente definitivos ya que la acción terapéutica depende tanto de la naturaleza o localización de la infección viral como de ciertas particularidades en la administración del producto biológico.

Lo que sí parece claro es que el sistema interferón activado por una infección viral específica en un huésped, no funciona en ausencia de otra o igual infección viral y que su actividad biológica la realiza a expensas de una glicoproteína antiviral, sintetizada "de novo", que es capaz de unirse a sitios específicos en la membrana de otras células y producir una señal que pone en marcha -en esta segunda población celular- la

síntesis de una nueva proteína que bloquea la replicación del virus. El interferón puede ser sintetizado en todas las células nucleadas del cuerpo (aunque no se conozca la inducción de interferón sobre eritrocitos aviares) pero su nivel de producción depende tanto de la naturaleza del virus inductor como de la capacidad de respuesta de la célula huésped y su acción presenta el determinante de ser especie-específica.

También puede haber inductores de interferón muy distintos de aquellos de naturaleza viral, así se encuentran desde grandes moléculas (DNA y RNA mono y bicatenario, lectinas, lipopolisacáridos) a otros microorganismos (bacterias, protozoos), pasando por sustancias de bajo peso molecular (tilorona, amino-thioles, colorantes).

En resumen, para que el interferón se produzca ha de darse un determinismo genético que capacite a la célula para reaccionar (cromosomas humanos 2 y 5 para la inducción y 21 para la aparición del estado de resistencia), ha de penetrar el virus y replicarse en la célula huésped y ponerse en contacto con los ribosomas de la misma, momento que se considera de señal para que la célula genéticamente capaz forme el mRNA del interferón que dará lugar a la aparición de esta glicoproteína que actuará a nivel de membrana de otras células. En cuanto a la base celular de la respuesta antiviral, parece ser que órganos con gran contenido de células reticuloendoteliales son los más activos y entre ellos destaca el bazo, aunque también ha de tenerse en cuenta el tropismo o afinidad del virus inductor por un determinado tipo de células puesto que, por ejemplo, existen virus neurotrópicos que producen los mayores niveles de interferón en cerebro.

También, a la hora de evaluar comparativamente sistemas productores de interferón hay que tener en cuenta además de la naturaleza del inductor y fenotipo de la célula huésped, otros parámetros biológicos como son: vía, dosis y momento de inducción, edad y temperatura normal del huésped o del cultivo celular y otras particularidades relacionadas con la inducción (sistémica o intramuscular).

Esta síntesis de interferón, además de estar mediada por una serie de condicionantes que pueden aparecer a nivel genético, bioquímico o clínico, está sujeta a la influencia de otras moléculas que interfieren en el mecanismo de síntesis. Así la presencia de algunos inhibidores metabólicos o que interfieran con la síntesis de ácidos nucleicos o proteínas pueden modificar aquel mecanismo. Por supuesto, como en el caso de la inducción, la inhibición puede presentar distintos niveles en función de la dosis o del momento de adición del fármaco o incluso origina un efecto de estimulación.

En los aumentos en la síntesis de interferón que, en una experiencia ya clásica de KE y cols (1966) se producen mediante inducción por endotoxinas en animales pretratados con puromicina se conoce como un fenómeno de "superinducción" que está siendo estudiado por bastantes investigadores por la posibilidad de aplicación que presenta, especialmente, en células diploides humanas. Según parece la superinducción se produce, casi exclusivamente, en células diploides deprimidas por actinomicina D, cicloheximida o puromicina y su dinámica se caracteriza por una inhibición previa de la síntesis que va seguida por un aumento en el nivel de interferón inducido.

Existen moléculas que, estudiadas en nuestro laboratorio, se presentan claramente como inhibidores de la producción de interferón; entre ellas destacan los antibióticos ansamínicos y es particularmente acentuada con la rifamicina SV. También se han observado depresiones en la síntesis de interferón condicionadas por la presencia de algunos análogos púricos o pirimidínicos que actúan como antimetabolitos inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos; o incluso inhibiciones a nivel del metabolismo celular por adenílico cíclico, cortisona y otros esteroides de naturaleza hormonal. Estas moléculas (AMPc, esteroides) junto con la de insulina pueden actuar como inhibidores o estimulantes de la síntesis de interferón según las circunstancias experimentales en que se produzcan.

En relación con las interacciones virus-interferón-huésped cabe decir que su efecto más que como una acción antiviral debería considerarse como una manifestación en las alteraciones que produce sobre la fisiología de la célula huésped, ya que no sólo puede efectuarse la multiplicación del virus, sino también el crecimiento intracelular de otros microorganismos, la división celular y la producción de anticuerpos; ello condiciona variaciones en la expresión de antígenos en la membrana celular y consecuentemente en la citotoxicidad de linfocitos y en reacciones celulo-trópicas de carácter fagocitario. Está claro que existe un paralelismo entre las cinéticas de actividad antiviral y acción inhibidora de la división celular; aunque, por otra parte se aumenta la citotoxicidad linfocitaria frente a células tumorales, el número de células citotóxicas naturales (natural killer), y la producción de ciertas proteínas. En el caso de estas interacciones a nivel de superficie celular

pueden encontrarse, desde nuestro punto de vista, algunas acciones paradójicas como son el hecho de que el interferón aumente las posibilidades de unión de la concanavalina A -que es un mitógeno- y disminuya el transporte y movilización de la timidina. Llama la atención las modernas corrientes de opinión científica que buscan la semejanza del interferón con ciertas hormonas glicoproteicas, principalmente por su estructura, tamaño, ausencia de consumo y actividad transportadora de mensajes a nivel de membrana. Y también es de interés muy particular, por las posibilidades que pueden tener en la modulación de inmuno-respuesta, aquellas interacciones entre el interferón y el sistema inmunitario del huésped, sobre el que puede ejercer un doble control, exaltándolo o deprimiéndolo, según las circunstancias experimentales; el tema está en sus comienzos y presenta grandes dificultades técnicas de estudio directo "in vivo" por precisar de grandes cantidades de interferón purificado, por desconocer la cinética del interferón y por su rápida eliminación del organismo. Pese a todo parece que el interferón produce una depresión o supresión de la respuesta inmune cuando se administra antes o simultáneamente al antígeno. Esta acción supresora parece ser ejercida sobre los linfocitos B y no sobre los macrófagos ya que según ciertos autores también puede aparecer, según las circunstancias experimentales, una estimulación de macrófagos por el interferón "inmune".

Por otra parte, al considerar estas relaciones entre interferón y respuesta inmune, es preciso señalar la existencia de otro tipo de interferón, llamado "inmune" o interferón II que se produce en leucocitos estimulados con lectinas, polisacáridos o en leucocitos antígeno-sensibilizados ante la presencia del mismo antígeno. Ambos tipos de interferón (clásico e



inmune) poseen algunas características particulares que pueden diferenciarlos entre sí aún dentro de la misma especie animal; ello no obstante, ambos confieren a las células la resistencia antiviral a través de una regulación por el mismo locus genético situado en el segmento distal del brazo largo del cromosoma 21.

Al considerar todos estos datos, varias y muy diversas incógnitas pueden surgir; así, si existen interferones cuyo Pm oscila de 20.000 a 100.000 daltons y es muy difícil obtenerlo en un estado de relativa pureza sin perder actividad ¿no será que existen unas moléculas monoméricas cuya actividad se manifiesta al unirse formando oligómeros o polímeros? o bien que sea necesaria la coexistencia de moléculas protectoras de esta actividad antiviral; el hecho de que enlaces - S - S - sean fundamentales para ello, habla en favor del determinismo de las estructuras terciarias. Se desconoce el papel de los grupos aminos, aunque se sabe que los grupos - SH no son esenciales y no se tiene idea de las relaciones estructura actividad en los interferones.

Existe gran variabilidad en el proceso de inducción, que es difícil de controlar, aunque se sabe que los virus siguen siendo los inductores de interferón más efectivos y así, las cantidades más significativas de interferón siguen alcanzándose en tejidos humanos y animales durante el curso de una infección viral; sin embargo, no está claro porqué la superinducción se produce casi exclusivamente en células diploides.

La inducción en aves, presenta algunas dificultades ya que según ciertos autores los virus de la peste aviar clásica y atípica en estado infectivo no eran capaces de inducir

síntesis de interferón en cultivos de fibroblastos de pollos porque actuaban inhibiendo la síntesis de proteínas de las células huésped.

En cuanto a mecanismos bioquímicos no está suficientemente estudiado el papel de los receptores de la glicoproteína inductora ni parece haber sido identificado el elemento desencadenante de la producción de TIP; desconociéndose si el cromosoma 21 tiene como función el regular la actividad o modular la disponibilidad de los receptores interferón-sensibles en la membrana.

La interacción del interferón con el sistema inmune puede ser de importancia a la hora de comprender su papel en la patogénesis de algunas enfermedades virales: por ejemplo, es un hecho ya demostrado que las infecciones virales van acompañadas de una inmunosupresión transitoria (DE MAEYER y cols. 1975) y es muy posible que este efecto sea debido al interferón inducido por virus más que a la destrucción del tejido linfoide por la acción viral (DE MAEYER y cols. 1975; RIVIERE y cols. 1977). De hecho, se ha demostrado recientemente utilizando suero anti-interferón, que la mayoría de las manifestaciones de la infección por el virus coriomeningitis linfocitaria en ratones lactantes son debidas al interferón inducido por el virus más que a los efectos citopáticos virales (RIVIERE y cols. 1977).

En estas relaciones interferón-inmunorespuesta es difícil establecer, por el momento, como pueden ser beneficiosos para el huésped, en infecciones virales, los efectos supresores del interferón sobre la respuesta inmune. Si el interferón es importante para el huésped como mecanismo de defensa en

infecciones virales y esta idea está hoy día bien fundamentada tras los recientes trabajos en los que se emplean suero anti-interferón en ratones con infecciones virales (GRESSER y cols. 1976 a y b) se podría especular que el interferón actúa como uno de los reguladores de la respuesta inmune en infecciones virales.

Parece claro, no obstante, que el interferón no es un ente único, que la división y función celular están moduladas por distintos mediadores, y que según los inmunólogos también existen mediadores determinantes del grado, amplitud y duración de la respuesta inmune. Cuando se aislen y caractericen todas estas sustancias será posible determinar si, como el interferón, existe una sola molécula o clase de moléculas, que ejerzan efectos múltiples sobre la célula. Pero el tema se complica si se tiene en cuenta que existen además diferencias estructurales en distintas clases de animales como aves y mamíferos, por ejemplo y que el tema de interferón en aves está mucho menos estudiado.

PARTE EXPERIMENTAL

I. PROTOCOLO

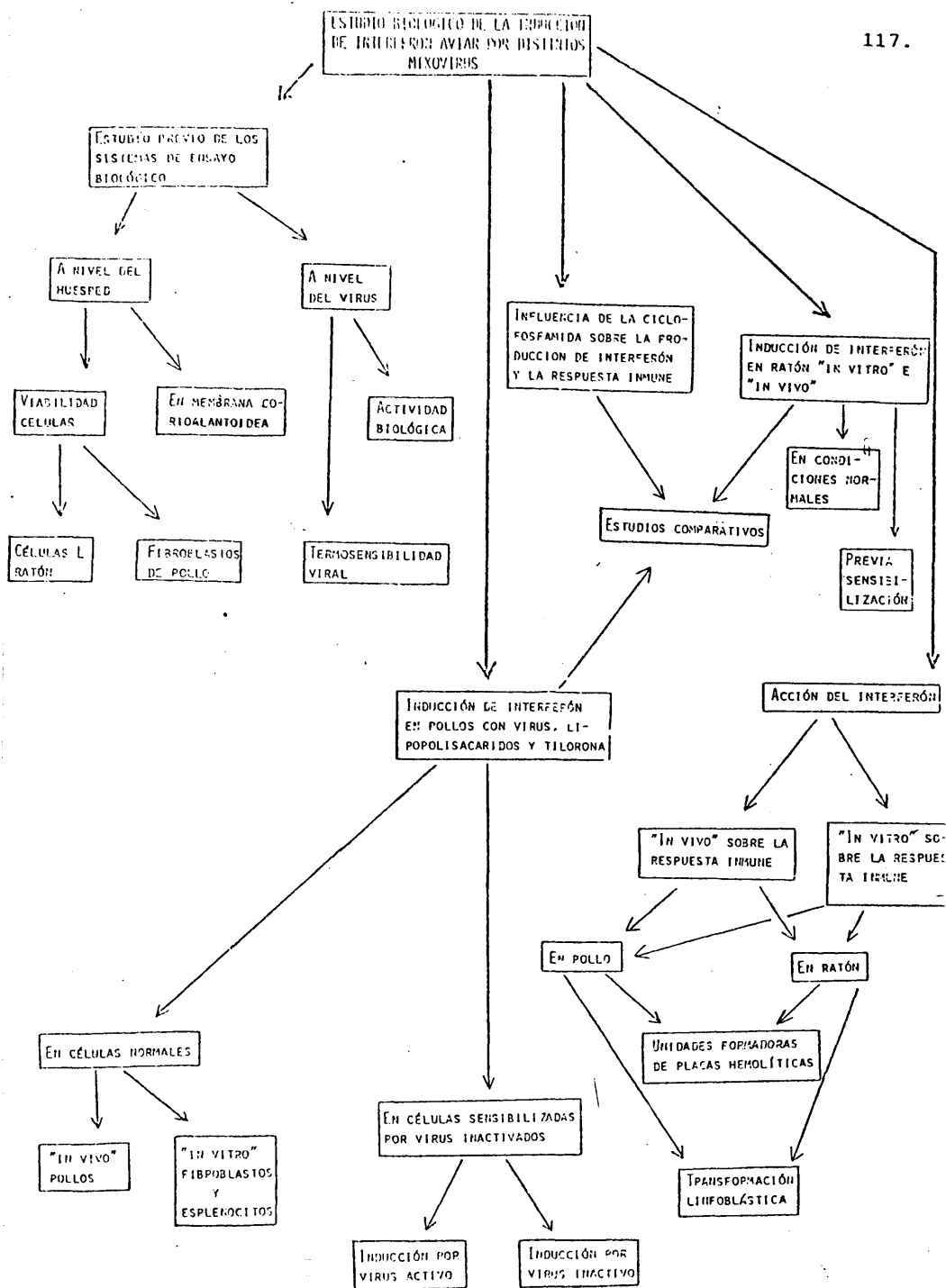
Una vez considerado el estado actual del tema en el que se aprecia la necesidad de aportar mas datos al conocimiento biológico de la inducción de interferón en aves y su significación para la inmunorespuesta del huésped a fin de poder establecer comparaciones con datos obtenidos en ratón por ser animales de distinto nivel de organización del sistema inmunitario, hemos planeado un protocolo experimental en el que se distinguen tres fases principales que se refieren a:

i) estudios previos del sistema biológico a distintos niveles de virus y huésped.

ii) determinación de la inducción de interferón controlando la posible influencia de los estados previos de sensibilización por virus, así como la influencia de agentes alquilantes del tipo ciclofosfamida.

iii) control de la acción biológica del interferón aviar "in vitro" sobre esplenocitos e "in vivo" sobre los propios animales inductores comprobando su acción sobre la inmunorespuesta.

Los distintos apartados de este estudio experimental se representan esquemáticamente a continuación con el fin de tener una idea de conjunto y precisar entre qué términos se establecen las comparaciones que nos han de permitir formarnos una idea de la significación biológica del interferón aviar, sus posibilidades de inducción y su actividad.



II. MATERIAL Y MEDIOS

1. Virus

En el presente trabajo hemos utilizado los seis virus que se indican a continuación, señalando su origen; de los cuales pertenecen al grupo Mixovirus: i, ii, iii, v

- i - Virus de la peste aviar clásica: Fowl plague virus (FPV)
-cepa *Rostock*- obtenido por pase en líquido alantoideo de huevos embrionados infectados.
- ii - Virus de la peste aviar atípica o de la enfermedad de Newcastle: Newcastle disease virus (NDV) -cepa *Italia*- obtenido por pase en líquido alantoideo de huevos embrionados infectados.
- iii- Virus Influenza -cepa *FM/1*- también obtenido por pase en líquido alantoideo de huevos embrionados.
- iv - Virus de la estomatitis vesicular: estomatitis vesicular virus (VSV) -cepa *Indiana C*- obtenido por pase en cultivo de fibroblastos y células L infectadas.
- v - Virus Sendai
- vi - Virus encefalítico equino este (EEE)

En cuanto a la procedencia de estos virus habremos de señalar que los FP, ND y Sendai proceden del "Max Planck Institut für Virusforschung" de Tubinga (Rep. Federal Alemana); el virus influenza de la colección del Instituto Jaime Ferrán de Microbiología del C.S.I.C. y el virus VSV de "The Animal Virus Research Institute" de Pirbright. Woking. Surrey. Gran Bretaña; el virus EEE de la colección del Instituto Jaime Ferrán de Microbiología y aislado en la epidemia de New Jersey el año 1933 de un caso fetal humano.

2. Células huesped

Según los diferentes propositos experimentales se han utilizado los seis distintos tipos de células que se indican a continuación:

- i - Cultivos celulares de fibroblastos de embrión de pollo de 10 días obtenidos por tripsinización en nuestro laboratorio.
- ii - Cultivos de células L murinas mantenidas en congelación a -70° C y suspendidas posteriormente en medio de crecimiento apropiado para su desarrollo.
- iii - Cultivos celulares de esplenocitos de pollo obtenidos por disgregación de bazo en nuestro laboratorio.
- iv - Cultivos celulares de esplenocitos de ratón obtenidos de la misma forma que los anteriores
- v - Hematíes de pollo
- vi - Hematíes de carnero

3. Animales de experimentación

En primer lugar, se han empleado pollos machos, raza Leghorn incubados y nacidos en nuestro laboratorio con el fin de evitar posibles interacciones serológicas indeseables dentro de nuestra experimentación. Según los casos, se han utilizado estos animales a distintas edades; recién nacidos con un peso de 10 - 15 g o bien con 1 mes de edad y un peso de 250 - 300 g.

Por otra parte, también hemos utilizado ratones, machos y hembras, raza Swiss, nacidos en nuestro laboratorio; todos tenían, en el momento de su empleo, 1 mes de edad aproximadamente y un peso de 16 - 18 g.

4. Endotoxinas

Se han empleado lipopolisacáridos endotóxicos (LPS) procedentes de P. aeruginosa y B. melitensis obtenidos respectivamente siguiendo los métodos descritos por WESTPHAL y JANN (1965) y LEONG y cols (1970) y purificando ambos por cromatografía en columna (BARASOAIN, 1976). Dicho material fue amablemente suministrado por la Dra. Isabel Barasoain de la Sección de Infecciones Microbianas de nuestro Instituto.

5. Medios para cultivo de células

Para las células de embrión de pollo se empleó un medio de crecimiento (MFC) que contenía:

Solución Hank's	94,7%
Hidrolizado de lactoalbúmina (Difco)	0,2%
Suero fetal bovino (Flow)	4,0%
Extracto de levadura (Yeastolate Difco)	0,1%
Rojo fenol (0,2%)	1,0%
Penicilina	100 U.I/ml
Estreptomicina	100 g/ml
Nistatina	20 U.I/ml
NaCO ₃ H (8,8%) hasta ajustar el pH a 7,2	

Como medio de mantenimiento (MFM) para células de embrión de pollo se utilizó una solución nutritiva conteniendo:

Solución Hank's	96,7%
Hidrolizado de lactoalbúmina	0,2%
Suero fetal bovino (Flow)	2,0%
Extracto de levadura	0,1%
Rojo fenol (0,2%)	1,0%
Penicilina	100 U.I/ml
Estreptomicina	100 g/ml
Nistatina	20 U.I/ml
NaCO ₃ H (8,8%) hasta ajustar el pH a 7,2	

Para las células L se empleó el MEM de crecimiento que contenía:

MEM (Minimum essential medium) Eagle modificado con sales de Earle y glutamina (1%) (Flow) diluido en agua bidestilada esteril	1.000 ml
Suero fetal bovino (Flow)	10%
Aminoácidos no esenciales (Flow)	1%
Penicilina	100 U.I/ml
Estreptomycin	100 g

o bien el MEM de mantenimiento, con la misma composición que el anterior pero con solamente 2% de suero fetal bovino

Las membranas corioalantoideas se mantuvieron sobre solución salina Earle, compuesta por:

NaCl	68 g.
KCl	4 g.
MgSO ₄ .7 H ₂ O	2 g.
NaH ₂ PO ₄	1,25 g.
Glucosa	100 g.
CaCl ₂	20 g.
Rojo fenol 1%	16 ml.
Agua bidestilada	950 ml

Finalmente, el medio RPMI 1640 para cultivos celulares fue obtenido comercialmente de los Laboratorio Flow (Gran Bretaña) y preparado según las indicaciones fijadas por los preparadores.

6 . Soluciones varias y tampones

Por último, se han utilizado:

i) Fosfato tampón salino (PBS) compuesto por:

NaCl	8 g.
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Agua bidestilada	1.000 ml
pH final	7,3

ii) Soluciones Hank's compuesta por

<u>Solución A:</u>	NaCl	80,0 g
	KCl	4,0 g
	CaCl ₂	1,4 g
	Mg SO ₄ · 7H ₂ O	2,0 g
	Agua bidestilada aprox.	450 ml

<u>Solución B:</u>	Na ₂ HPO ₄	0,6 g
	KH ₂ PO ₄	0,6 h
	Glucosa	10,6 g
	Agua bidestilada aprox.	450 ml

Solución C: Solución 1% de rojo fenol 16 ml.

- 1) Disolver en agua los componentes en el orden indicado.
- 2) Añadir lentamente y sin dejar de agitar la solución A sobre la B.
- 3) Añadir el rojo fenol a la mezcla de la solución A y B
- 4) Completar el volumen total a 1000 ml con agua bidestilada
- 5) Esterilizar por filtración positiva
- 6) Conservar a 4°C.

iii) Solución tripsinizante, compuesta por:

Tripsina	2,5 g.
Solución salina Hank's	1 ml
Penicilina	1 ml
Estreptomicina	1 ml
Utilizada en solución 0,125 %	

iv) Solución de Alsever, compuesta por:

Glucosa	20,5 g
Citrato sódico	8,0 g
Acido cítrico	0,55 g
NaCl	4,2 g
Agua bidestilada	1000 ml

v) Solución tampón de veronal, compuesta por:

NaCl	85 gr
Acido 5,5 dietil barbitúrico	5,75 g
5,5, dietil barbitúrate sódico	3,75 g
CaCl ₂	0,28 g
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	1,68 g
Agua bidestilada	1000 ml

III. TECNICAS

1. Obtención de las suspensiones infectivas virales

Estas se prepararon según la naturaleza del virus en líquido alantoideo (NDV, FPV, Influenza y Sendai), sobre fibroblastos de pollo (VSV) o en cerebro de ratón (EEE), siguiendo las particularidades del método correspondiente.

i) Para el NDV se prepara una suspensión, en PBS, de líquido alantoideo infectado con este virus, que contenga 100 DLE₅₀ y con esta suspensión en dosis de 0,2 ml por huevo se inoculan huevos embrionados de 10 días en saco alantoideo a través de la cámara de aire. A partir de este momento y cada 12 horas se observan los huevos embrionados infectados. Se toman solamente los embriones muertos entre las 36 y 72 horas después de la inoculación ya que fuera de este intervalo, dicha muerte no tiene valor representativo. Los embriones muertos durante el periodo de 36 a 72 horas se mantienen a 4° C para obtener una máxima clarificación del líquido alantoideo.

Se abren en condiciones estériles y se extrae el líquido alantoideo de cada uno de ellos, utilizando pipeta especial para hacer metódicamente estas dos pruebas:

- a) para control de esterilidad bacteriana, mediante siembra del líquido alantoideo en medios de cultivo sólido y líquido: se mantenían las siembras en estufa a 37° C durante 7 días como mínimo y se observan los tubos cada 24 horas.
- b) de hemaglutinación orientadora rápida, para comprobar si el embrión ha muerto por la acción del virus o por traumatismo operador, viendo ya en este momento si existe una mínima capacidad hemaglutinante.

Durante el periodo de comprobación de la esterilidad bacteriana, el material infectivo seleccionado tras la hemaglutinación se mantiene a -40° C. Una vez comprobada y asegurada tal esterilidad y desechado el material que presenta signos de contaminación, se reúne todo el líquido alantoideo infectado y se centrifuga durante 10 minutos a 1.200 rpm. El sobrenadante obtenido sirve como nuevo pase de virus repartiéndose en viales (1 ml) para conservación a -60° C.

ii) Para la obtención de FPV, Influenza y Sendai se sigue la misma pauta que con el NDV, utilizando huevos embrionados de 10 días, inoculando la misma dosis viral, por la misma vía de administración y realizando todas las pruebas y controles citados anteriormente.

iii) El pase de VSV se prepara inoculando fibroblastos de embrión de pollo con 100 DICT₅₀, 24 horas después de la infección viral las células empiezan a presentar efectos citopáticos y es el momento con mayor cantidad de partículas víricas infectivas, por lo que se recoge entonces el medio infectivo. Infecciones por debajo de las 100 DICT₅₀ tienen el inconveniente de que las partículas defectivas, muy abundantes en este vi-

rus, producen efectos autointerferentes lo que da lugar a títulos bajos de infectividad. Las fases siguientes de centrifugación, control de esterilidad y almacenamiento son las mencionadas en los virus antes citados.

iv) El pase de VSV se prepara inoculando cultivos de células L con 100 DICT₅₀ para fibroblastos de pollo y siguiendo la misma pauta anteriormente reseñada para el pase del mismo virus sobre fibroblastos. Este virus ha quedado completamente adaptado a la multiplicación sobre células L después del tercer pase sobre dichas células.

v) Para la obtención del virus Encefalítico Equino Este, se inoculan por vía intracerebral ratones de 15-18 g de peso con una dosis de 0,03 ml del pase precedente del virus. Para ello se anestesian los ratones con éter, en cámara cerrada, durante el tiempo necesario para la inoculación y se esteriliza con iodo y alcohol la parte central occipital donde se ha de efectuar la inoculación.

Injectada la cantidad antes mencionada se pasa alcohol por la zona de inoculación y se dejan los ratones en la cámara de inoculación hasta comprobar que su recuperación es completa. Se observan cada 12 horas los ratones infectados y se separan aquellos que, pasados 3 - 4 días, muestran patentes signos de parálisis y de los que podemos asegurar que en la observación siguiente habrán aparecido muertos.

Reunidos los ratones con síntomas de enfermedad se les mata practicando un corte con tijera estéril a la altura del corazón. Una vez desangrado se sujeta el animal a una plan-

cha de corcho por su hocico, extremidades y cola y se procede a la desinfección general del dorso y particularmente de la zona craneal. Con pinzas y tijeras estériles se separa la piel de esa zona y se levanta la calota quedando a la vista el cerebro del animal que se extrae con una espátula metálica mantenida en alcohol, previamente flameada.

Los cerebros se suspenden en caldo común (cerebro 0,45 g - caldo 4,5 ml) en un triturador de vidrio. Una vez triturados se recoge la suspensión en tubos de centrifuga, procediéndose a su centrifugación, control de esterilidad y almacenamiento según se ha reseñado en los casos anteriores.

2. Inactivación de los virus.

En ocasiones hemos tenido necesidad de trabajar con los distintos agentes virales teniendo únicamente en cuenta su valor antigénico y no su poder infectivo, que como es lógico interfiere alterando los resultados reales.

Esta inactivación se ha realizado por dos métodos según los casos.

2.1. Termo - inactivación viral

En ciertos momentos de nuestra experimentación hemos recurrido a la inactivación de virus por la acción del calor. La técnica es muy simple y consiste en llevar los viales que contienen el virus, ND, FP, influenza y Sendai, a estufa a 56° C durante 2 horas manteniéndolos en agitación y comprobando posteriormente que ha tenido lugar tal inactivación mediante

inoculación de estos virus en huevos embrionados de pollo. Comprobada la supervivencia de los embriones se da por válida la inactivación.

2.2. Inactivación viral por Betapropiolactona

Para ello, se prepara una suspensión viral en solución salina que contenga 10.000 DLE₅₀/ml con cada uno de los virus. Se prepara también una dilución de BPL (Fluka AG, Suiza) que se añade a la suspensión viral en cantidad necesaria para que la dilución final sea 1/3000.

Estudios realizados por POLLEY y GUERIN (1957 a, b) demostraron que la infectividad será destruida más rápidamente (por alteración del ácido nucleico, en nuestro caso RNA) a pH 8 que a pH 6, pero que la capacidad antigénica se conservaba mejor a pH 7. Esta antigenicidad permanece inalterada manteniendo sus componentes antigénicos intactos.

Se introduce en la suspensión viral con BPL una pieza magnética y el conjunto se monta sobre agitador magnético durante 2 horas a 37° C. Después de este tiempo se recoge el virus efectuando control de esterilidad bacteriana en agar y caldo común. Para confirmar la inactivación viral, se inocula la suspensión en huevos embrionados de 10 días con la dosis y vía de administración habituales en nuestro trabajo y señalada con anterioridad.

Al mismo tiempo se inoculan pollos de 1 mes de edad, también con el virus supuestamente inactivado, en cantidad de 1 ml por vía intramuscular. Demostrada, también la supervivencia de los pollos se da por segura la inactivación del virus.

La observación de los huevos embrionados tienen lugar cada 12 horas durante 5 días comprobando la supervivencia de los mismos

3. Titulación de la infectividad viral.

Se establecen paralelamente dos series de cultivos celulares, una serie es infectada con la suspensión viral y la otra permanece con el medio no infectado y actúa como control. Manteniendo las dos series en las mismas condiciones experimentales se determinan cada 24 horas los efectos citopáticos aparentes en la serie infectada patentizados por comparación con la serie testigo sin infectar y se calculan las dosis infectivas para cultivos de tejidos (DICT_{50}) por medio del método de titulación de REED y MUENCH (1938). Reed y Muench introducen el concepto de dosis letal 50% (DL_{50}) para cada especie animal utilizada en el laboratorio y por extensión establecen la dosis letal para embrión de pollo 50% (DLE_{50}), representando en ambos casos la dilución decimal de virus que produce efectos en el 50% de los individuos infectados; y con la misma base estadística introducen el concepto de DICT_{50} .

Puesto que los intervalos entre las diluciones, al ser decimales, son grandes y las DL_{50} (DLE_{50} ó DICT_{50}) no coinciden fácilmente con las diluciones decimales del virus, sino que la harán con una dilución intermedia que es preciso hallar. Reed y Muench establecieron tres condiciones para poder calcular la dilución exacta:

i) Cada grupo de animales, huevos o cultivos de tejidos (p. ej. tubos), deben estar representados al menos por 5 individuos para que sea más correcta la representatividad de

las evaluaciones estadísticas puesto que depende directamente de la cantidad de resultados obtenidos.

ii) La dilución a calcular debe estar comprendida por lo menos entre dos diluciones superiores y dos diluciones inferiores.

iii) La DL_{50} ó $DICT_{50}$, una vez reunidos los resultados, ha de establecerse por el método de totales acumulativos, que suma para cada dilución todos los individuos que han muerto o presentado efectos causados por la acción viral, a partir de las diluciones menos concentradas de las suspensiones de virus y todos los individuos que han sobrevivido o no han presentado efectos causados por el virus, a partir de las diluciones más concentradas.

A continuación se aplica una fórmula general con los datos obtenidos o bien se aplica una fórmula simplificada de cálculo, que es a lo que nosotros hemos recurrido en nuestro trabajo:

$$DL_{50} = \frac{\text{mortalidad inmediateam. superior al 50\%} - 50}{\text{mortalidad inmediateam. superior al 50\%} - \text{mortalidad mínim. inf. al 50}}$$

En los cálculos sobre $DICT_{50}$ se consideran los tubos donde aparece citolisis como datos de positividad infectiva.

El resultado de la fórmula anterior se suma como fracción decimal al exponente negativo de la dilución de virus más concentrada de las dos que comprenden al 50% de las muertes.

3.1. Valoración por efectos citopáticos

Para la titulación de virus por su efecto citopático, sobre cultivos de fibroblastos y células L, se preparan los cultivos celulares apropiados en tubos de cultivo o frascos hexagonales. Cuando la monocapa celular adherida al vidrio es continua se elimina el MFC o el MEM de crecimiento según sean fibroblastos o células L respectivamente, que se lavan con PBS templado y una vez eliminado, se inoculan con 0,1 ml por tubo y 0,3 ml por placa de la dilución correspondiente del virus a titular. La dilución viral permanece durante todo este tiempo en baño a 4° C. El grupo de tubos o placas que actúan como testigos son sometidos a los mismos lavados, pero el inóculo infectivo es sustituido por un volúmen igual de PBS que queda sobre la monocapa celular.

Tras un periodo de adsorción de 1 a 3 horas a 37° C, dependiendo del virus a titular, se elimina el inóculo infectivo, añadiendo 1 ó 10 ml de MFM ó MEM de mantenimiento (fibroblastos o células L) a los recipientes que contienen los cultivos. Todo el grupo se incuba en estufa a 37° C.

Cada 12 horas se observan al microscopio de Óptica invertida las monocapas infectadas y controles, comparando y midiendo la diferencia entre ambas a través de los efectos citopáticos que presentan las infectadas, desde una leve acción sobre las células hasta la destrucción total de la monocapa celular, frente a una perfecta estabilidad morfológica y metabólica de los testigos. La titulación se expresa en DICT_{50} calculadas por el método de Reed y Muench.

3.2. Valoración mediante placas infectivas

Para la titulación basada en la producción de placas infectivas, se sigue la técnica introducida por DULBECCO (1952) y está basada en el hecho de que una partícula viral infecta a una célula, la cual libera virus que pasan a infectar a las células vecinas siempre que estén mantenidas bajo un medio sólido que impida una diseminación viral a distancia. Las placas infectivas producidas son características para cada virus, aunque un virus puede presentar marcas infectivas de dos o tres tamaños. Como pudieron comprobar DULBECCO y VOGT (1954 a, b) no aparecían partículas infectivas cuando se añadía antisuero específico al medio sólido de recubrimiento.

La validez de esta técnica es dependiente de los siguientes requisitos:

- a) la formación de placas depende únicamente de la presencia de virus, no debiendo formarse en ausencia del mismo.
- b) el número de placas o marcas infectivas que aparece está en relación directa con la concentración viral ensayada.
- c) debe ser reproducible, esto es, una misma muestra viral, en distintos ensayos, debe proporcionar resultados superponibles.

La técnica presenta dos variantes, en una, las células están en monocapa; mientras que en otra las células quedan en suspensión. La primera de ellas, la original, es la que hemos aplicado en nuestra metodología y consiste en preparar un cultivo de células en concentración apropiada en placas de vidrio neutro o de plástico tratado para cultivos. Las células se incuban a 37° C hasta la formación y fijación del epitelio celular, momento en el que se elimina el medio de crecimiento celular que

baña la monocapa y se lava con PBS templado, añadiendo después 0,3 ml de la suspensión viral a titular.

Tras un periodo de adsorción apropiado para cada virus se elimina el inóculo infectivo mediante adsorción con pipeta Pasteur añadiendo a partes iguales medio nutritivo (medio de mantenimiento sin rojo fenol, 2 x) y agar hasta que se forma una capa solidificada sobre el epitelio celular. En ese momento se llevan los cultivos celulares a 37° C para su incubación durante un periodo variable de 2 a 4 días dependiendo del virus estudiado.

Transcurrido este tiempo aparecen unas marcas incolores en la monocapa celular que se pueden poner de manifiesto por adición de una segunda capa de agar con colorante vital (rojo neutro) que coloreará todas las células de la monocapa que permanecen vivas, apareciendo perfectamente nítidas las marcas de las células destruidas por la acción viral. El valor o título infectivo viene expresado en unidades formadoras de placas infectivas por unidad de volumen del inóculo viral.

3.3. Estudio de la termosensibilidad de los virus con respecto a su poder infectivo y hemaglutinante

Dentro del plan de trabajo que teníamos trazado, nos surgió el problema de saber si el título hemaglutinante del medio de cultivo celular o de M.C.A. sufría una disminución a consecuencia de la temperatura (37° C) en que habitualmente están mantenidos los cultivos celulares, a la que se une, la acidificación del medio por el metabolismo celular.

Tenía gran importancia fijar este parámetro dentro de nuestras condiciones experimentales, para saber si podría darse una inactivación térmica de las hemaglutininas, durante el tiempo de 24, 48, 72 y 96 horas, en que habían de hacerse estas titulaciones de las hemaglutininas a lo largo de este trabajo.

Dado el hecho de que los virus suspendidos en medio nutritivo, pero sin células vivas, son incapaces de multiplicarse y sufren una inactivación por la temperatura, nuestro experimento consistía en observar la pérdida del poder citopático de los virus experimentados, con determinación, al mismo tiempo, del título hemaglutinante de los cuatro mixovirus ensayados, puestos en suspensión en medio de mantenimiento celular a dos pH diferentes.

A este fin hicimos para cada virus 2 series paralelas de 15 tubos: en la 1ª serie, se puso medio de mantenimiento a pH 6 (pH resultante en los medios de cultivo celulares al cabo de 96 horas, según habíamos comprobado en nuestras pruebas anteriores) y, en la 2ª serie, se puso medio de mantenimiento a pH 7,2 (el usual al empezar cualquier experimento en cultivo celular).

En cada serie de tubos se hizo una dilución del líquido alantoideo infectado con el virus a estudiar, para lograr 10.000 DICT₅₀ final, tapando los tubos con goma para evitar el cambio del pH del medio.

Efectuada la inoculación del virus, se hizo toma de una muestra de la suspensión y se tituló el virus en su poder

hemaglutinante y en su DICT_{50} , considerando éste el momento 0; a las 24, 48, 72 y 96 horas, se hicieron tomas de todos los tubos en cada una de las dos series y se determinaron las DICT_{50} y HA.

4. Preparación de cultivos celulares

En este trabajo hemos tenido que utilizar tres tipos de células cuya preparación presenta distintas particularidades según se puede ver a continuación:

4.1. Fibroblastos de embrión de pollo

El cultivo de fibroblastos se prepara a partir de embriones de pollo de 10 días de edad que se extraen estérilmente del huevo. Se separan cabeza, extremidades y vísceras, que se desechan; del tronco que se lava abundantemente con PBS para eliminar hemáties y grasa, para después de ser troceado con pinzas curvas ser lavado nuevamente con abundante PBS. Este material es sometido a digestión por tripsina (Difco 250) al 0,125 en solución de Hank's, en agitador magnético durante 20 minutos a 37° C. Pasado este tiempo el sobrenadante, cargado de células, es recogido y llevado a matraz, donde se pone también PBS frío que paraliza la actividad de la tripsina, manteniéndolo a 4° C. El sedimento, al que se añade nueva tripsina es sometido a agitación y esta operación de toma de sobrenadante se realiza cada 10 minutos hasta que se agote el material, persiguiendo durante todo el proceso una buena digestión del tejido intercelular sin que las células resulten alteradas.

La suspensión celular total (800 a 1.000 ml) es repartida en tubos de centrifuga y sometida a centrifugación durante

10 minutos a 1.000 rpm. El sedimento obtenido es lavado en PBS y sometido a nueva centrifugación después de cada lavado en el que se eliminan por pipeteo los agregados celulares que se forman en tales centrifugaciones. El sedimento final es nuevamente suspendido en PBS y filtrado a un primer matraz con una capa de gasa estéril y luego a un segundo matraz con dos capas de gasa.

Tras la filtración, y efectuada una nueva centrifugación, es obtenido un último sedimento del que se toma 0,1 ml de células y se suspende en 10 ml de medio. La suspensión se tiñe con colorante vital (azul tripano o rojo neutro) y se efectúa el recuento en cámara Thomas o Neubauer. El paquete celular así obtenido lleva generalmente un contenido celular mayor que el indicado por lo que es necesario hacer una nueva dilución para obtener una concentración final de 10^6 células/ml de medio de crecimiento celular. Preparada así la concentración celular deseada, esta suspensión es repartida en cantidades de 1 ml por tubo y 10 ml por frasco hexagonal (ambos de vidrio Pyrex neutro). Tubos y frascos deben ser tapados con tapones de goma para tener un sistema herméticamente cerrado. Cuando se desea trabajar con placas de cultivo la suspensión celular se reparte a razón de 5 ml por placa.

Tubos, frascos y placas son llevados a estufa a 37° C donde permanecerán hasta que se haya formado un epitelio celular continuo y los fibroblastos adquieren su morfología típica.

4.2. Esplenocitos

El cultivo de esplenocitos se efectúa a partir de bazo de pollo o ratón. Se matan los animales por dislocación cervical y se abren con material estéril extrayendo los bazo,

que se llevan a placas Petri que contienen solución de Hank's fría donde se eliminan las membranas serosas adheridas a estos órganos. Los bazo se llevan a triturador de vidrio con una cantidad pequeña de PBS frío; tras conseguir una disgregación celular perfecta se filtra con pipeta Pasteur a través de un matraz con gasa para eliminar grumos, grasa, etc.

La suspensión de esplenocitos es lavada dos veces en PBS frío centrifugando durante 10 minutos a 1.000 rpm. Tras obtener el paquete celular final se efectúa el recuento de células tal y como se ha reseñado en el apartado anterior sobre fibroblastos de embrión de pollo. En esta ocasión el colorante utilizado es el anaranjado de acridina. Conocida la cantidad de células se hacen las diluciones precisas para conseguir una concentración final de 5×10^6 esplenocitos/ml en medio RPMI 1640.

La suspensión celular así preparada se reparte en placas de plástico de 7 cm de diámetro a razón de 3 ml de suspensión por placa; o bien, en microplacas de plástico especiales para cultivo de tejidos con 0,2 ml de la suspensión celular.

Placas y microplacas son llevadas a estufa de CO₂ al 5% y a 37° C con humedad controlada, donde se mantienen hasta su utilización en la técnica correspondiente.

4.3. Células L

Las células L en cultivo, en frascos hexagonales de vidrio neutro, mantenidas en MEM, se someten a lavado de la monocapa y tripsinización de la misma hasta su desprendimiento total. Estas células son suspendidas en MEM (con 5% SFB)

que contiene DMSO al 4%, distribuyendo esta suspensión en ampollas. Dichas ampollas son sometidas a un descenso gradual de temperatura hasta los -70°C , momento en que se almacenan como medio de mantenimiento hasta su utilización.

Cuando se debe preparar un cultivo de células L, se toma el número deseado de ampollas mantenidas a -70°C , se descongelan y se centrifugan para disponer del sedimento. Estas células son suspendidas en MEM y distribuidas a razón de 7 ml en frascos de plástico con tapón de rosca; se llevan rápidamente a estufa de CO_2 , manteniendo el tapón flojo con el fin de que se evapore el DMSO, apretando y cerrando el tapón totalmente a las 24 horas.

A partir de las 24 horas de su preparación, se comprueba el estado del cultivo celular al microscopio de óptica invertida, estudiando el momento oportuno para dar pases de cultivo sucesivos que mantengan esta línea de células en su fase normal de multiplicación.

5. Obtención de eritrocitos

Hemos necesitado utilizar eritrocitos de distintas especies animales y de su preparación damos idea a continuación.

5.1. Eritrocitos de pollo

Previo sangría por punción intracardiaca de pollos jóvenes, la sangre se mezcla en tubos de centrifuga con igual cantidad v/v de solución citratada Alsever. Tras agitación suave se añade solución salina facilitando la suspensión de los hematies, para a continuación centrifugar la suspensión a 4°C

durante 5 minutos a 1.000 rpm. El sedimento de hematíes es resuspendido en PBS o solución salina fríos y se vuelve a centrifugar en las condiciones anteriores; cuando el sobrenadante aparece totalmente transparente y límpido se elimina por succión con pipeta quedando un sedimento de hematíes en el fondo con una fina capa superior de glóbulos blancos.

El paquete se mantiene en nevera a 4° C hasta el momento de su utilización en pruebas de hemaglutinación o inhibición de hemaglutinación. Este sedimento puede utilizarse dentro de los 3 días después de su obtención.

5.2. Eritrocitos de carnero

Estas células, procedentes de laboratorios comerciales, son sometidas a centrifugación a 4° C durante 5 minutos a 1.000 rpm previa suspensión en solución salina fría. El sedimento de hematíes así obtenido, es resuspendido en la misma solución salina anterior y se centrifuga de nuevo hasta que el sobrenadante esté totalmente claro, como en el caso de los hematíes de pollo.

Este paquete de hematíes también se mantiene en nevera a 4° C hasta el momento de su utilización como antígeno inmunizante de los animales estudiados o para la aplicación de la técnica de Jerne. (JERNE y NORDIN, 1963; JERNE y cols. 1963; INGRAHAM, 1963; BERNOVSKA y cols., 1963; JERNE y cols. 1974).

6. Prueba de hemaglutinación

Se ha utilizado el método de SALK (1944) para la prueba de hemaglutinación, mejorado por HIERHOLZER y SUGGS (1969) y aplicando en nuestro caso la modificación del micro-método por TAKATSY (1955) y SEVER (1962).

Se preparan hematíes de pollo según se ha explicado anteriormente. Se distribuyen volúmenes exactos de 0,05 ml de veronal en cada uno de los pocillos de la microplaca. Cada línea de la placa corresponde a un virus o dilución del mismo estudiada, añadiendo por tanto, en el primer pocillo de cada línea, una gota de virus con otra micropipeta de 0,05 ml. Con los micro diluidores se van realizando las diluciones al duplo para cada muestra de virus, para finalmente añadir a cada pocillo 0,05 ml de la suspensión de hematíes al 0,5%. Paralelamente a esta operación, en otra línea de pocillos de la placa se ponen 0,05 ml de solución veronal al 1/5 y 0,05 ml de hematíes en solución al 0,5%, actuando como controles en la hemaglutinación.

A partir de este momento se deja la placa en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 2 horas. Pasado este tiempo, se efectúa la lectura de los resultados obtenidos en cada una de las filas, para conocer el valor o capacidad hemaglutinante de los virus estudiados. La reacción de hemaglutinación se considera positiva cuando todo el fondo del pocillo aparece cubierto por un velo continuo rosado de hematíes aglutinados; y es negativa, cuando se observa un botón rojo intenso de hematíes sedimentados en el fondo del pocillo.

El título hemaglutinante obtenido viene expresado por el recíproco de la dilución final en la que aparece hemaglutina-

ción completa, lo que consideramos una unidad hemaglutinante.

7. Células formadoras de anticuerpos IgM

Aunque se trata de un método con frecuencia citado en muchos trabajos de inmunología consideramos oportuno referir nuestro "modus operandi" por las peculiaridades que pudieran haberse introducido

7.1. Inmunización de animales frente a SRBC

Para la sensibilización de animales donadores de esplenocitos hemos escogido grupos de ratones de peso equivalente (16-18 gr) e igual sexo y pollos con peso de 80-100 gr dependiendo de la prueba a realizar en el momento.

Hemos preparado los hematíes de carnero tal y como se explicó en el apartado correspondiente. Tras la última centrifugación se suspenden los hematíes en solución salina de forma que queden a una concentración final de 8×10^6 SRBC/ml. Ante la falta de datos sobre la realización de la técnica de Jerne sobre esplenocitos aviares nos fue imprescindible determinar la dosis de hematíes necesaria para sensibilizar a los pollos. De los resultados obtenidos se fija como dosis sensibilizante la concentración final de 8×10^7 en cantidad de 1 ml por vía intraperitoneal.

En los ratones inyectamos 0,1 ml de la suspensión SRBC también vía intraperitoneal y, transcurridos 4 días, se determina el número de células de bazo formadoras de anticuerpos como

se describirá a continuación.

7.2. Técnica de Jerne

En ella cabe distinguir las siguientes fases:

a) Preparación del agar, que se realiza el día anterior y a la concentración de 0,5% en solución de Hanks y añadiendo a continuación DEAE-dextrano hasta una concentración final de 0,2 mg/ml para contrarrestar las propiedades anticomplementarias del agar (LIEBHABER y TAKEMOTO, 1961). Esta mezcla agar-DEAE dextrano se deja enfriar guardando en nevera a 4° C hasta el momento de su utilización.

b) Preparación de suspensiones de esplenocitos de animales sensibilizados con SRBC; para ello los animales son muertos por dislocación cervical; se extraen los bazo estérilmente disecando el tejido conectivo adherido al mismo; se pesan los bazo y se introducen en placa Petri estéril que contiene solución de Hanks (EAGLE, 1959) y antibiótico (penicilina y estreptomycin). Se disgregan los bazo presionándolos contra una rejilla pequeña de acero y, después, cada suspensión de células se filtra a través de una capa doble de gasa o nylon con el fin de eliminar los residuos de tejido y aglomerados procedentes de la vaina que envuelve los esplenocitos.

Se lavan dos veces estos esplenocitos en PBS mediante dos centrifugaciones a 1000 rpm durante 10 minutos, manteniendo en frío las suspensiones celulares durante toda la manipulación. A continuación, se determina el número de células nucleadas en cada suspensión mediante recuento con un hemocitómetro en un microscopio de óptica invertida; de aquí se prepara una dilución

en líquido de Hanks que contenga 10^6 esplenocitos/ml.

c) Preparación de los hematíes de carnero a partir de SRBC de 1 a 3 semanas de edad, mantenidos en solución Alsever, ya que cuando estas células están recién obtenidas son menos susceptibles a la lisis mientras que las células viejas son excesivamente frágiles. Estas células se lavan tres veces mediante centrifugación y resuspensión en solución salina; tras la última centrifugación el paquete celular es resuspendido en líquido de Hanks de tal forma, que se obtenga una suspensión final, de aproximadamente, 4×10^9 SRBC/ml.

d) Durante las centrifugaciones anteriores, el agar preparado según se indicó previamente es calentado hasta su fusión para distribuirle, entonces, en los tubos preparados en baño de agua a 46°C y numerados por grupos según el tipo de tratamiento recibido por los esplenocitos. Cada tubo recibe 0,8 ml de la suspensión de agar.

e) A partir de este momento, y trabajando con rapidez hasta el final, se añade a cada tubo de agar mantenido a 46°C , 0,15 ml de la suspensión SRBC agitando sobre un aparato Vortex con una velocidad regulada. A continuación, se añade a cada tubo 0,25 ml de la suspensión de células linfoides apropiada y sacando el tubo del baño de agua se añade 0,1 ml de una suspensión 1/10 de complemento de cobaya, previamente preparado, en solución de Hank y mantenido en hielo. El conjunto se agita de nuevo en Vortex y se extiende rápidamente sobre placas Petri.

Cuando las células linfoides estudiadas proceden de pollos se utiliza una mezcla de complemento de cobaya y de com-

plemento de pollo en proporción 4:1, aunque en la misma cantidad total que la citada anteriormente. Esta proporción hubo de determinarse experimentalmente, y aquí nos interesa destacar que en los primeros experimentos efectuados, siguiendo esta técnica aplicada a los esplenocitos aviares, no obtuvimos resultados tan demostrativos como los obtenidos con esplenocitos murinos, por esta razón empezamos a ensayar el empleo de complemento de pollo, sólo omezcado con el complemento de cobaya hasta que se lograron resultados plenamente satisfactorios.

Las placas Petri se mantienen a temperatura ambiente hasta que el agar se solidifica. A partir de este momento, se llevan durante 3 horas a una estufa de 37° C con humedad controlada y atmósfera de CO₂ al 5%. Pasado el tiempo citado, se hacen visibles las marcas pequeñas, redondas y pálidas, contra el fondo rojizo del césped y que corresponden a cada célula formadora de anticuerpo; éstas se contaron por placas o grupos de placas, comparando con los testigos inmunizados y no inmunizados.

8. Inducción de interferón

Dado nuestros propósitos de estudiar comparativamente la inducción de interferón sobre distintos tipos de células aviares "in vitro" e "in vivo", así como sobre esplenocitos murinos, hemos tenido necesidad de diversificar la técnica para obtener interferón distinguiendo entre las particularidades de las seis técnicas que siguen.

8.1. Inducción de interferón en pollos y en ratones con virus y lípopolisacáridos.

Para la inducción de interferón en pollos se han utilizado como inductores el virus VSV, y dos tipos de endotoxinas

bacterianas, habiendo seguido el método descrito por RONDA y ALONSO (1974) y RONDA y cols. (1976). Se prepararon 6 grupos de 10 pollos, a los dos primeros grupos, se les inyectó intravenosamente en la vena del ala 1×10^3 DICT₅₀ de virus; otros dos grupos fueron inoculados por la misma vía con LPS de P. aeruginosa en dosis de 100 ng/100 gr de peso vivo y, los animales de los otros dos grupos restantes, fueron inoculados con LPS de B. melitensis por la misma vía de administración y con la dosis antes citada.

Seis horas después de la inoculación del inductor se practica sangría a muerte por punción intracardiaca de los pollos, según resultados obtenidos por RONDA y cols (1976) que demuestran que la máxima concentración de interferón circulante en suero tiene lugar entre 4 y 6-7 horas. Los sueros de los diferentes grupos, una vez recogidos, se centrifugan a 30.000 g durante 40 minutos y el sobrenadante obtenido se almacena a -20° C hasta su titulación. Paralelamente se llevan a cabo las pruebas de esterilidad bacteriana.

Cuando el suero que contiene el interferón es el procedente de animales inoculados con VSV y que por tanto contiene virus infectivo, que daría lugar posteriormente a la aparición de efectos citopáticos en pruebas de titulación, se realiza una primera diálisis a pH 2.2 en tampón fosfato citrato durante 24 horas a 4° C y dos diálisis posteriores a pH 7.4 en tampón fosfato durante 2 días consecutivos a 4° C. Mediante esta dialisis alcanza un pH final de 7.2 eliminando así la infectividad sin alterar el título de interferón contenido en el suero.

La titulación del interferón, tanto el inducido por VSV como los producidos por LPS de B. melitensis y de P. aerugi-

nosa, fue llevada a cabo utilizando el método de FULTON y ARMITAGE (1951) mediante la reducción del poder hemaglutinante de mixovirus multiplicados en M.C.A.

Visto el bajo título de interferón en suero, se efectuó una segunda serie en la que se utilizó como inductor el NDV y los LPS en cantidades de $1\mu\text{g}/100$ gr de peso vivo. La titulación, en este caso, se hizo siguiendo la técnica de Dulbecco. sobre fibroblastos de embrión de pollo utilizando el VSV como virus interferido. Sin embargo, en algunos casos, para alcanzar las unidades interferón necesarias, hubimos de concentrar el suero mediante Carbovax o a través de membranas de Amicón.

Para la inducción de interferón en ratón hemos seguido una técnica exacta a la utilizada en pollos. Así se ha llevado a cabo la inducción con NDV (1×10^3 DICT₅₀ de virus) en un grupo de 40 ratones; y otros dos grupos con el mismo número de animales fueron inoculados con $1\mu\text{g}/100$ gr de peso vivo de LPS de P. aeruginosa o de B. melitensis. Todas las inoculaciones fueron realizadas intravenosamente en las venas caudales.

Según la experiencia de nuestro laboratorio, y al igual que sucede en pollos, un intervalo de 4 a 6 horas después de la inoculación del inductor es suficiente para obtener los más altos títulos de interferón circulante; por ello 6 horas más tarde fueron sangrados a muerte los ratones por punción intracardiaca reuniéndose por separado los sueros correspondientes a cada grupo. El tratamiento de los sueros así obtenidos fue idéntico al seguido con el de pollos (diálisis ácida y diálisis neutralizante).

La titulación se realizó igualmente siguiendo el método de Dulbecco sobre células L y con VSV como virus interferido e igualmente se hicieron concentraciones por medio de Carbovax o membranas de Amicón cuando el método lo aconsejó.

8.2. Inducción de interferón sobre fibroblastos de embrión de pollo.

Para ello se preparó un cultivo celular de fibroblastos sobre frascos hexagonales según la técnica reseñada anteriormente en la preparación de cultivos celulares. Cuando la monocapa celular, observada al microscopio de óptica invertida, presenta un aspecto continuo y uniforme, se inocula con NDV como inductor de interferón en dosis de 1×10^3 DICT₅₀. Tras un periodo de adsorción de 2 horas se lava la monocapa con PBS templado, añadiendo 10 ml de MFM a cada uno de los frascos hexagonales preparados. Uno de los grupos que actúa como testigo no fue inoculado con el virus.

Se mantienen los cultivos en estufa a 37° C, durante 24 horas, al cabo de los cuales se recoge el medio de cultivo que contiene el interferón liberado por las células de embrión de pollo. Teniendo en cuenta que el medio contiene partículas virales activas, se procede a la inactivación del mismo utilizando ácido perclórico a una concentración final 0,15 N; éste se añade al material recogido, dejándolo en nevera a 4° C durante 30 minutos. Pasado este tiempo se forma un precipitado que se elimina mediante centrifugación a 1.000 rpm durante 10 minutos.

El ácido residual es neutralizado con OHK 5 M hasta pH 7,2 y el nuevo precipitado, formado a baja temperatura, es

separado tras nueva centrifugación en las mismas condiciones anteriores. El sobrenadante considerado interferón bruto se almacena en congelación a -20°C , efectuando pruebas de esterilidad bacteriana y viral.

También, antes de la utilización de este interferón así preparado, se determina su eventual toxicidad y para ello se preparan tubos de cultivo de fibroblastos y con concentraciones altas del interferón. Formada la monocapa celular se retira el MFC que la cubre durante el crecimiento celular y se añade el interferón diluido en MFM a razón de 1 ml por tubo. El total de tubos se mantiene en estufa a 37°C durante 24-48 horas, observándose los cultivos celulares al microscopio de óptica invertida y determinando si la dilución de interferón ha resultado tóxica para las células; en caso positivo, se valora el grado de toxicidad en función de la dilución. En aquellos casos en que aparecen indicios claros de toxicidad, se procede a efectuar una diálisis en solución de Hank durante 48 horas a 4°C . Pasado este tiempo se recoge el medio con interferón, se determina su esterilidad bacteriana y se comprueba nuevamente la toxicidad sobre cultivos de fibroblastos.

Cuando en ensayos previos de titulación de interferón se obtuvieron títulos bajos llevamos a cabo la concentración de los sueros o de los medios celulares, por medio de placas de Amicón, o bien utilizando Carbovax a una dilución del 5%. Con ambos métodos se logra una reducción en volumen de 10 veces con el correspondiente aumento en titulado de la glicoproteína activa presente.

8.3..Inducción de interferón sobre células 1

Se ha procedido del mismo modo que queda reseñado para los cultivos de fibroblastos. La única diferencia que cabe destacar es el empleo de MEM con suero fetal bovino al 10% durante el crecimiento de la monocapa celular y el uso de MEM con suero fetal bovino al 2% para la dilución de interferón y el mantenimiento de la monocapa celular durante el tiempo de permanencia en estufa.

También en este caso se ha llevado a cabo la inactivación viral, control de esterilidad bacteriana, control de toxicidad y diálisis, como se ha indicado en el apartado anterior.

8.4. Inducción de interferón sobre esplenocitos de ratón y pollo

Con este propósito, se prepara una suspensión del paquete de esplenocitos de pollo o de ratón, obtenido por centrifugación, en medio RPMI 1640 que contenga 5×10^6 esplenocitos/ml. La suspensión se reparte a razón de 3 ml, en placas Corning o Greiner que son de plástico especial para cultivo de tejidos. En este caso se utilizan como inductores de interferón los virus ND y FP; y la infección de los cultivos se lleva a cabo con 1.000 DICT₅₀, para fibroblastos, de los virus ND y FP según el experimento.

El conjunto se mantiene en estufa de CO₂ a 37° C durante 18 horas. Transcurrido este tiempo se recoge el sobrenadante por succión con pipeta Pasteur y se controla la esterilidad bacteriana. A continuación se efectúa una diálisis de los interferones obtenidos, en las condiciones citadas con anteriori-

dad y una vez recogidos y dializados se determina de nuevo su esterilidad bacteriana antes de guardar el material en congelación a -20°C .

8.5. Inducción de interferón "in vitro" sobre esplenocitos estimulados por infección viral.

Como animales donadores de esplenocitos hemos utilizado ratones Swiss de 18-20 grs, y pollos Leghorn de 80-100 grs. Para la sensibilización de los animales hemos utilizado 10^4 DICT de NDV ó FPV que, para infección en pollos, fue inactivado con BPL. La infección se llevó a cabo por vía intravenosa.

En total, y para cada virus, tanto en ratones como en pollos, se han hecho 5 grupos; uno de ellos que no fue infectado con virus y los otros cuatro que recibieron, respectivamente, 1, 2, 3, ó 4 dosis sensibilizantes con 7 días de intervalo.

Los esplenocitos obtenidos según el proceder habitual y puesto en suspensión (5×10^6 células x ml) en RPMI 1640 con suero fetal de ternera y 2 M final 5×10^{-5} M fueron cultivados en placas de plástico Corning en atmósfera de CO_2 al 5%. Cinco horas después de iniciado el cultivo, fueron infectados con 10^3 DICT de NDV ó FPV activo o termoinactivado, tanto para esplenocitos sensibilizados con el virus homólogo o con el heterólogo, como para los esplenocitos procedentes de animales no sensibilizados.

Después de 48 horas de la inoculación del virus estimulador, se hizo una toma del cultivo y, previa centrifugación, se practicó una dialisis durante 24 horas a pH 2,5 seguida de otras dos dialisis de 24 horas a pH 8,5 para lograr la inactivación de los virus.

El interferón presente en el medio de cultivo de los esplenocitos fue titulado por el método de Dulbecco midiendo la reducción del número de placas infectadas obtenidas en cultivos celulares previamente tratados con el interferón e inoculados con VSV. Para la titulación del interferón obtenido en esplenocitos murinos se utilizaron células L929, mientras que para el de esplenocitos aviares se emplearon fibroblastos de pollo.

8.6. Inducción de interferón sobre pollos y ratones con tilorona

a) Hemos administrado tilorona en el agua de bebida de ratones y pollos en dosis de 0,3 mg/ml, desde 10 días antes de la sensibilización de animales con SRBC; cada 24 horas se añade un nuevo grupo de animales de forma que al final se han formado 10 grupos diferentes con arreglo al número de días que han recibido la droga. En el día 11 todos los grupos, más otro grupo que actuará como testigo y que no ha recibido tilorona, se inmunizan con SRBC, como se ha indicado en la técnica correspondiente, determinando mediante la técnica de Jerne, 96 horas más tarde, el número de células productoras de anticuerpos y llevando también a cabo en ensayos aparte la medida de la incorporación de ^3H -timidina.

b) Hemos seguido exactamente y en paralelo la misma pauta de administración de tilorona con otra serie de grupos de ratones y pollos. Transcurridos los 10 días, estos animales se inmunizan con SRBC y 96 horas más tarde, se sangran a muerte determinando el título de interferón sérico inducido por la droga estudiada.

Como justificación de esta prueba hemos de recalcar que en nuestras primeras determinaciones al hacer la sangría a

muerte para la obtención del suero a partir del cual se habría de determinar los valores de interferón circulante se observó que la eliminación de la sangre producía una baja sensible en el número de placas hemolíticas determinadas por el método de Jerne, por esta razón la técnica a) se hizo siempre sacrificando a los animales por dislocación cervical.

c) Con el fin de contar con una serie testigo de inducción de interferón con tilorona, pero en ausencia de SRBC (a pesar de que en ningún momento ha aparecido en la bibliografía ningún dato que indique la inducción de interferón por los eritrocitos, se preparó otra serie en paralelo que en esencia es la misma que la especificada en b), pero prescindiendo de la inoculación de SRBC para así también poder controlar un parámetro ajeno a las posibilidades inductoras de interferón por la tilorona.

9. Titulaciones de interferón

Consecuente con las distintas fuentes de interferón obtenido "in vivo" e "in vitro" son los distintos métodos para la titulación, tanto en suero como en cultivos celulares.

9.1. Preparación de piezas de membrana corialantoidea

Una de las técnicas aplicadas para la titulación del interferón presente en suero de pollo nos lleva a la necesidad de preparar piezas de M.C.A., para ello se utilizan huevos embrionados de 12 días que se abren en condiciones estériles por el lado opuesto a la cámara de aire, dando salida al embrión y partes anexas por esta apertura.

En estas condiciones, la M.C.A. ha quedado adherida a la cáscara de huevo y se puede cortar en piezas cuadradas de 1 cm aproximado de lado, procurando que estas piezas contengan las zonas más ricas en vasos sanguíneos. Se separa la membrana de la cáscara, que es desechada, y aquella se lava dos veces en PBS, quedando ya en condiciones de ser mantenida en tubos preparados para tal fin con solución salina de Earle.

9.2. Titulación del interferón presente en sueros de pollo sobre M.C.A.

Para este propósito hemos puesto en práctica el método de FULTON y ARMITAGE (1951) con piezas de M.C.A. preparadas según se indica previamente.

Se establecen series de diluciones de interferón en solución salina de Earle al título de: 1/3, 1/5, 1/10, 1/30, 1/50 y 1/100. Para cada dilución de interferón se emplean 18 tubos de cultivo añadiendo un último grupo que actúa como control de virus. Se reparten las diluciones correspondientes de interferón en los tubos de cultivo a razón de 2 ml por tubo, dejando los controles de virus con solamente 2 ml de la solución de Earle e introduciendo en todos y cada uno de los tubos una pieza de M.C.A. Después se disponen los tubos en tambor giratorio inclinado con velocidad de 5 vueltas por minuto y se lleva a 37° C durante 18 horas; pasado este tiempo, se desechan aquellos tubos que presentan nivel bajo de metabolización del medio por replegado o muerte de la membrana.

Las piezas de M.C.A. son lavadas en PBS abundante y a continuación se reponen 2 ml de solución salina de Earle conteniendo 1×10^3 DLE₅₀ del virus (ND, FP, influenza y Sendai según los casos). Se deja de nuevo el sistema en tambor girato-

rio en estufa a 37° C durante 48 horas; una vez transcurrido este tiempo, se procede a la toma del medio contenido en cada grupo de tubos.

Se obtienen así para cada grupo de virus ensayado 28 muestras (6 diluciones más el grupo control de virus para cada uno de los tres interferones inducidos por VSV, LPS de B. meli-tensis y LPS de P. aeruginosa) de las que hay que determinar la actividad del interferón mediante control de reducción del poder hemaglutinante de los virus mencionados.

ISAACS y LINDENMANN (1957 a, b) encontraron, según resultados de sus análisis estadísticos, que una reducción de 2 unidades logarítmicas en base 2 en el título hemaglutinante, indica ya un claro contenido de interferón. Tal logaritmo está directamente relacionado con la concentración de interferón en la escala decimal y se define como unidad interferón, la dilución de éste, que produce una reducción del 75% en el poder hemaglutinante con respecto al control de virus sin tratar.

Este método exige al menos la utilización de 6 tubos y el cálculo de la media geométrica de los títulos hemaglutinantes alcanzados por los tubos control que no han sido tratados con el interferón. La media geométrica resulta de gran aplicación dentro del campo de la Inmunología para calcular la media de los títulos: hemaglutinantes, de anticuerpos, de sueros interferón, etc. cuando sus valores no se pueden distribuir normalmente pero sí sus logaritmos.

9.3. Titulación de interferón en cultivos celulares

Acudimos al método de Dulbecco, que requiere la preparación de cultivos celulares específicos para cada interferón, pues una de las propiedades de esta glicoproteína es precisamente su especificidad de especie. Así pues, se preparan cultivos de fibroblastos para interferón inducido sobre fibroblastos o sobre esplenocitos de pollo y, cultivos de células L, para interferón inducido sobre las mismas células o sobre esplenocitos de ratón.

El procedimiento es paralelo en su mayor parte al explicado para la titulación viral. La titulación del interferón se efectúa en placas Petri de vidrio estériles, que son mantenidas en estufa a 37° C con 5 ml de la suspensión de células con los medios de crecimiento correspondientes para cada uno de los dos tipos de células empleadas. Como es habitual en nuestro sistema de estudio observamos la monocapa celular al microscopio de óptica invertida y aproximadamente 24 horas después de su preparación, como sucede normalmente, esta monocapa presenta un aspecto regular y continuo.

Se preparan diluciones de interferón en MFM ó MEM de mantenimiento según sea interferón aviar o murino en la proporción de: 1/20, 1/40, 1/80, 1/100 y 1/160, respectivamente. Se retira el medio de crecimiento que contienen las placas y se reemplaza por 5 ml de las diluciones de interferón anteriores, previa distribución de las placas en grupos de cinco, según la proporción anteriormente citada. Dos grupos quedan solamente con medio y son las destinadas a actuar como testigos, uno de virus y otro de células.

Las placas se mantienen en estufa a 37° C durante un periodo de 18 horas; transcurrido este tiempo, se prepara una dilución de VSV (procedente de pase sobre fibroblastos o adaptado en células L), que contenga de 80-100 UFP. Después se retira el medio que cubre la monocapa celular, que se lava abundantemente con PBS templado y se inocula cada placa (excepto las que quedan como testigo de células) con 0,2 ml de la dilución viral. Se llevan las placas a estufa durante un periodo de adsorción de 2 horas y posteriormente se lava de nuevo la monocapa con PBS templado. A partir de este momento la técnica es igual a la descrita para titulación viral: recubrimiento con capa de agar, coloración, etc. En este caso, cuando aparecen las marcas o placas infectivas, se recuentan las placas Petri tratadas con distinta proporción de interferón y los testigos de virus, buscando aquella dilución de interferón que haya dado lugar a una reducción del 50% en el número de placas lisadas respecto a los testigos de virus. Se admite que en esa dilución existe una unidad interferón.

10. Titulación de complemento

Para todos los ensayos hemos utilizado complemento de cobaya en solución isotónica (obtenido comercialmente) previa titulación del mismo. Se busca en esta titulación la "Unidad de Complemento", que es la cantidad más pequeña de complemento que produce hemólisis completa, de este modo trabajaremos siempre con diluciones en las que sabemos existe como mínimo una unidad complemento.

Para esta determinación es necesaria la utilización de suero hemolítico anticarnero o hemolisina cuya unidad mínima hemolítica es la cantidad del mismo que, en presencia de la dosis eficiente de complemento, produce (en 30 minutos a 37° C

en baño maria) la lisis completa de 0,5 ml de suspensión de hematíes al 5%.

Sabiendo que la hemolisina posee una dosis hemolítica de 0,003 se prepara la solución madre, según indicación del Laboratorio, con 0,1 ml de hemolisina en 1,66 ml de solución salina.

Por otra parte, se lleva a cabo una suspensión de SRBC al 2,5% que mezclamos a partes iguales (v/v) con la hemolisina durante 15 minutos a temperatura ambiente. Durante estos 15 minutos se prepara una solución de complemento al 1/10 en un medio isotónico, como suero fisiológico.

Se disponen en una gradilla dos filas de tubos de hemolisis; en la primera fila se distribuye el complemento diluido en volúmenes crecientes: 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1 - 1,2 - 1,4 - 1,6 y 1,8 ml y se añade a cada tubo la cantidad de solución salina necesaria para completar un volumen de 2 ml en cada uno de los tubos.

Se pasan 0,3 ml de solución de complemento de estos tubos a sus correspondientes en la segunda fila añadiendo 0,2 ml de la mezcla hemolisina - SRBC mantenida a temperatura ambiente. Se prepara un tubo control con el sistema hemolítico (hemolisina SRBC). Finalmente se dejan los tubos durante 30 minutos a 37° C en baño maria, y al cabo de este tiempo se observa en qué dilución de complemento aparece hemolisis completa y por tanto contiene una unidad de complemento.

También se ha seguido la misma técnica para la titulación del complemento de suero de gallina procedente de animales nacidos y criados en nuestras instalaciones.

11. Estimulación de esplenocitos sensibilizados

Para este proposito utilizamos esplenocitos procedentes de ratones Swiss de 16 - 18 gr y pollos de 60 - 80 gr. previamente sensibilizados con NDV ó FPV como miembros de las familias paramixoviridae y orthomixoviridae, respectivamente.

Para la sensibilización de los animales hemos utilizado 10^4 DICT de NDV ó FPV que, para infección en pollos fueron previamente inactivados con BPL. La infección se llevó a cabo por vía intravenosa.

En total, y para cada virus, y tanto en ratones como en pollos, se han hecho 5 grupos; uno de ellos, que no fue infectado con virus, y los otros que recibieron 1, 2, 3 ó 4 dosis sensibilizantes con 7 días de intervalo. Finalizado el tiempo de incubación de la infección correspondiente, los animales fueron sangrados a muerte por punción intracardiaca y el suero fue utilizado en las pruebas de inhibición de la hemaglutinación.

Los esplenocitos, obtenidos según el proceder habitual y puestos en suspensión (5×10^6 células x ml) en RPMI 1640 con suero fetal de ternera y 2-mercaptoetanol a dilución final 5×10^{-5} M, fueron repartidos en cantidades de 200 μ l por pocillo en placas tipo "microtiter" con fondo plano. En todos los casos se utilizaron tres placas, una para esplenocitos procedentes de animales sensibilizados con FPV, otra para sensibilizados con NDV y otra para células testigo de animales sin tratar. Después, de forma seriada, se fueron añadiendo 10 μ l de las suspensiones virales (10^3 DICT en fibroblastos) de NDV, FPV, FLU, Sendai y 10 μ l de suspensión viral (10^2 DL en ratón) de E.E.E., que sirvió como testigo de un virus completamente ajeno a los

míxovirus. Por otra parte, como testigos de actividad blastogénica, se incluyeron series estimuladas inespecíficamente con 3 μ g de PHA y con 1 μ g de Con A (Concanavalina A grado III y Phytohemagglutinin Sigma Chem. Comp. St. Louis EE.UU) y una tercera serie como testigo absoluto, sin virus ni estimulantes mitogénicos.

Las placas de microcultivo se mantienen en estufa con CO₂ al 5% y con humedad controlada, durante 72 horas a 37° C. Transcurrido este tiempo el cultivo celular recibe un pulso de ³H-timidina de actividad 5 mCi (The Radiochemical Centre - AMERSHAM - Gran Bretaña) (0,05 μ Ci por pocillo). Se lleva de nuevo la placa a estufa de CO₂ durante 24 horas. A partir de ese momento (96 horas en total, desde la puesta en cultivo), se recogen los cultivos celulares con un cosechador de células MASH II (Microbiological Associates, BETHESDA, MD. EE.UU).

Las tiras de papel (Glass Fiber filter Whatman - Grade 934 AM) donde por presión quedan marcados unos discos que en su superficie retienen las células son llevados a estufa a 50° C durante 2 horas para secado. Posteriormente se van separando los discos que se depositan en viales de vidrio con tapón de plástico con 2 ml de líquido de centelleo (Tolueno 1.000 ml dimetil-POPOP 0,1 g - PPO 4 gr).

Estos viales se introducen en otros mayores de vidrio con tapón de plástico hermético que serán los que se leerán en el contador de emisiones β (Intertechnique - Francia) que nos proporcionará el número de cuentas por minuto (cpm) de cada uno de los cultivos preparados.

12.- Tratamiento de pollos y ratones con interferón exógeno

Como interferones exógenos para los ratones se han utilizado los preparados por inducción con NDV y los LPS de B. melitensis y P. aeruginosa sobre células L y como interferones para los pollos se han utilizado los inducidos por NDV y LPS de B. melitensis y P. aeruginosa sobre fibroblastos de embrión de pollo.

Distinguimos dentro de la misma técnica dos apartados:

1) Tratamiento de ratones con interferón exógeno.

Hemos administrado los interferones por vía intramuscular utilizando dosis únicas de 500, 1.000 y 2.500 UI/10 gr de peso vivo a razón de 1 ml repartido en dos inyecciones simultáneas de 0,5 ml en las zonas musculares de las extremidades posteriores.

El tratamiento tiene lugar desde 20 días hasta 1 día antes de la inmunización de los animales con SRBC.

2) Tratamiento de pollos con interferón exógeno

Estos pollos son sometidos al mismo tratamiento que el mencionado en el caso de los ratones recibiendo las dosis de interferón aviar de 500, 1.000 y 2.500 UI/10 gr de peso vivo por la misma vía.

En ambas especies animales, transcurridos cuatro días después de la inmunización con SRBC se ha procedido a la preparación de esplenocitos para realizar la técnica de Jerne y la medida de la blastogénesis por incorporación de ^3H -timidina en

la síntesis de DNA según se indicó en el apartado 11 de técnicas.

13. Tratamiento in vitro de esplenocitos aviares y murinos con interferón.

a) Se han inmunizado ratones y pollos con SRBC y después de 96 horas se lleva a cabo la preparación de esplenocitos hasta obtener la suspensión en solución de Hanks de 2×10^6 esplenocitos/ml, que se reparte en una serie de tubos estériles que contendrán cada uno 1 ml de dicha suspensión.

b) Paralelamente se preparan diluciones de interferón con un resultante final de 500, 1.000 y 2.500 UI/ml.

Para los esplenocitos de ratón se ha utilizado el interferón inducido en células L 929 por NDV y los dos LPS mientras que para los esplenocitos procedentes de pollos se ha empleado el interferón producido en fibroblastos de pollo con los mismos inductores.

La suspensión de esplenocitos preparados según se indica en a) recibe 1 ml de interferón preparado según b) y se hacen contactos variables de 1 a 10 horas a 4° C. Pasados estos tiempos de contacto se hace tres lavados (por centrifugación) de los esplenocitos con solución Hanks para eliminar el interferón.

c) Se hace una nueva suspensión de esplenocitos en solución Hanks efectuando un recuento para ajustar la suspensión a 1×10^6 células continuando en este momento la técnica

de Jerne y la determinación de la blastogénesis inducida por mitógenos determinada por incorporación de ^3H -timidina en la síntesis de DNA según se indicó en el apartado 11 de Técnicas.

IV. RESULTADOS

De acuerdo con nuestro protocolo experimental hubimos de realizar una serie de ensayos previos que habrían de determinar unos parámetros básicos para cada sistema biológico de ensayo; así estudiamos las curvas de viabilidad de las células empleadas en los cultivos de tejidos, vitalidad de la membrana corioalantoidea, termoestabilidad viral y también la actividad biológica del NDV, FPV, influenza y Sendai en fibroblastos.

1. Estudios previos de los sistemas biológicos de ensayo

Estos experimentos comprenden dos niveles según se refieran a células huésped o a los virus:

1.1. Viabilidad y supervivencia de fibroblastos de pollo

Nuestro objetivo fue determinar el número de células vivas presentes en función del número de horas transcurridas desde la puesta de las células en cultivo. Para efectuar el recuento de las células en cultivo, se trataron con tripsina para separar el cultivo del vidrio, se lavaron con PBS (mediante centrifugación), se suspendieron en PBS y tiñeron con colorante vital, realizando el recuento celular cada 12 horas.

Los resultados expresados en la Fig. 10 ponen de manifiesto tres partes dentro de la curva; una primera, que comprende las primeras 12 horas en la que se observa la poca estabilidad del cultivo celular durante este periodo; hecho evidente ante la gran dispersión de resultados en los recuentos efectuados, que queda confirmado por la observación al microscopio de óptica invertida. En esta fase aparece el epitelio celular discontinuo formado por células muy redondeadas, unas que flotan en el medio que se eliminarán en el lavado y otras que se fijarían posteriormente al epitelio. También existen zonas de acúmulos celulares. En la observación de 24 horas, las células flotantes van desapareciendo y las lagunas epiteliales van quedando cubiertas por células que adquieren poco a poco una forma prismática.

En la segunda parte de la curva, periodo comprendido entre las 36 horas y el cuarto día, los resultados van siendo menos dispersos, principalmente en las 48 horas después de la preparación del cultivo celular; este hecho, parece indicar que el cultivo ha llegado a su máxima estabilidad, lo que también queda confirmado tras la observación (al microscopio) de un epitelio completamente cubierto por células que crecen en el sentido del eje mayor y que adopta formas triangulares y aciculares muy alargadas, típicas de los fibroblastos.

Finalmente, la tercera parte de la curva indica nuevamente una dispersión de datos y disminución en el recuento efectuado; esto coincide con la degeneración del cultivo celular observada al microscopio, y pone de manifiesto unas células redondeadas de aspecto rugoso que poco a poco se van desprendiendo aisladas o, generalmente, formando grumos celulares.

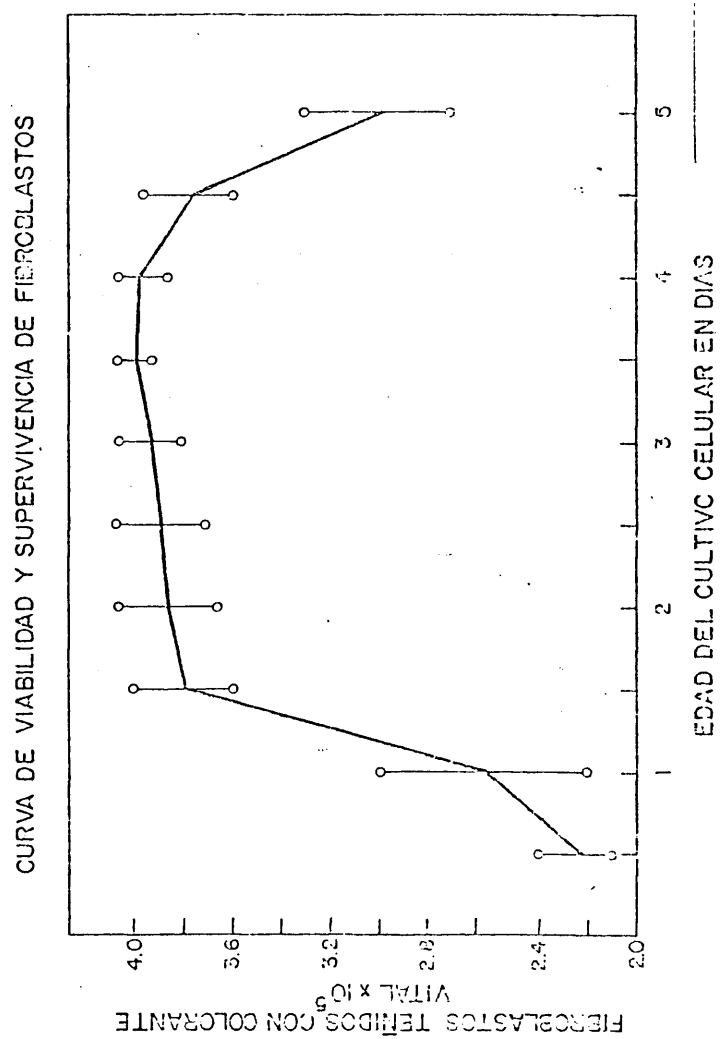


FIGURA 10

El viraje de color del medio de mantenimiento hacia un tono amarillento indica una acidificación del mismo a consecuencia del metabolismo celular, este hecho coincide con la progresiva degeneración del cultivo observada al microscopio de óptica invertida.

1.2. Viabilidad y supervivencia de células L

Las células L preparadas para su cultivo, tal y como explicamos en Material y Métodos, son observadas al microscopio de óptica invertida cada 12 horas a partir del momento de su preparación.

La primera observación pone de manifiesto un gran número de células flotantes en el medio de crecimiento celular frente a una pequeña proporción de células con formas redondeadas fijadas a la pared del frasco de cultivo.

Transcurridas 24 horas a partir del momento de la preparación del cultivo celular, podemos observar una gran disminución en el número de células flotantes en el medio celular, presentándose un epitelio con pequeñas lagunas desprovistas de células que presentan formas poligonales diversas y dejan algunos espacios intercelulares.

La observación realizada después de 36 horas de preparación, puso de manifiesto un epitelio continuo prácticamente en su totalidad, que, a las 72 horas se presenta totalmente cubierto por quedar las células perfectamente adosadas unas a otras.

Cuando el epitelio presenta el aspecto descrito, se elimina el medio de crecimiento y se reemplaza por medio de mantenimiento.

La observación diaria de los cultivos al microscopio de óptica invertida nos indicó que este tipo de cultivo celular permanecía inalterable durante un periodo muy prolongado de tiempo, con lo cual conseguimos que al multiplicarse cada 3 días las células L podíamos disponer de tres frascos de células hijas por cada frasco original.

1.3. Vitalidad de la membrana corialantoidea

Al igual que estudiamos la viabilidad de los fibroblastos y células L comprobamos si la vitalidad de la M.C.A. era suficiente para constituir un buen sustrato celular para la multiplicación de los virus y poder así determinar la actividad de ciertos interferones. Con este propósito determinamos, cada 12 horas, la vitalidad de los fragmentos de membrana, preparando para ello tres grupos de tubos pirex con piezas de M.C.A. suspendidas en solución de Earle manteniendo el total de tubos a 37° C en tambor giratorio.

En el primer grupo se observó el estado macroscópico de los fragmentos en cuanto a superficie y estado de los vasos sanguíneos. Transcurridos 4 ó 5 días a partir de la fecha de preparación pudimos observar que la superficie de las piezas presentaban unas rugosidades visibles macroscópicamente y con los bordes replegados sobre sí mismo. Por otra parte, los vasos sanguíneos han perdido su color rojizo presentando un aspecto pardo oscuro. Sobre las membranas del segundo grupo de los pre-

parados se realizó una tinción con colorante vital (rojo neutro) y, transcurrido el mismo tiempo que el mencionado en el primer grupo, pudimos observar que las piezas ya no tomaban el colorante vital.

En el tercer grupo, y tras un cambio del medio Earle a pH neutro, se observa la acidificación del mismo debida al metabolismo celular. El pH del medio no varía después de las 12 horas posteriores al cambio correspondiente a las 48 horas, indicando la ausencia de metabolismo celular.

En resumen, y tras este conjunto de observaciones, pudimos comprobar que la M.C.A. era un buen sustrato celular para la multiplicación de los virus entre las 12 y 36 horas, periodo en el que pensábamos realizar nuestros experimentos.

1.4. Actividad biológica del NDV, FPV, influenza y Sendai en fibroblastos.

Estos resultados tienen como base unas experiencias realizadas por nosotros (Tesis de Licenciatura, 1976) y de ellas se deducen las condiciones óptimas de trabajo que fueron convenientemente confirmadas y ampliadas para el virus Sendai en esta investigación. Con ello se demostró que las dosis virales infectivas óptimas para cultivos de tejidos (DITC) es de 10^4 para todos los mixovirus empleados. A modo de ejemplo se muestran diversos grados de destrucción celular por la acción del FPV (Figs. 11, 12, 13 y 14)

1.5. Termosensibilidad viral

Conocido el hecho de que los virus suspendidos en medio nutritivo sin células vivas son incapaces de multiplicarse

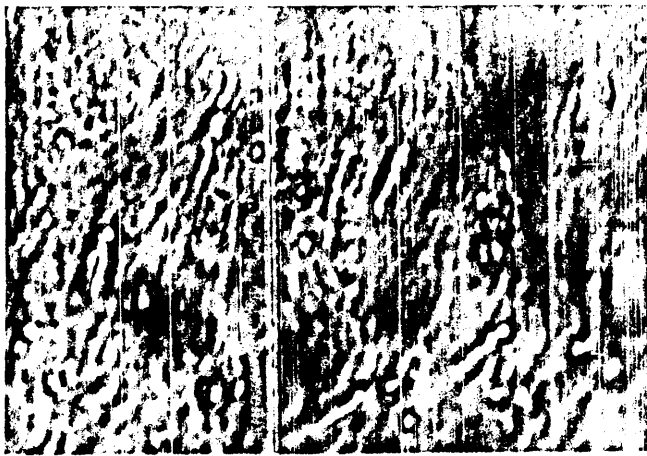


Fig. 11.- Aspecto normal de fibroblastos de embrión de pollo

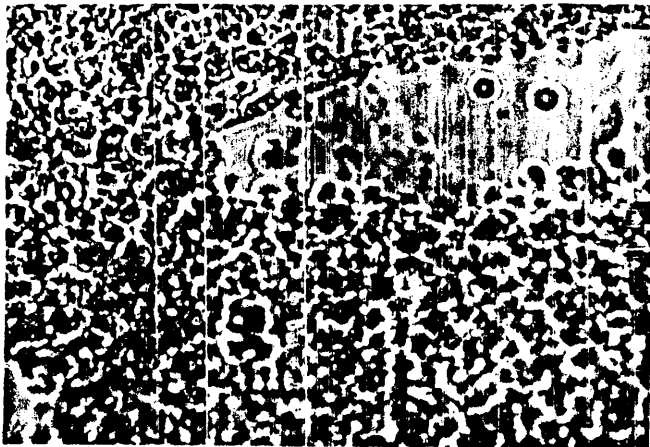


Fig. 12.- Fibroblastos de embrión de pollo 24 horas después de la infección con FPV (10^3 DICT) (aumento 150 x)

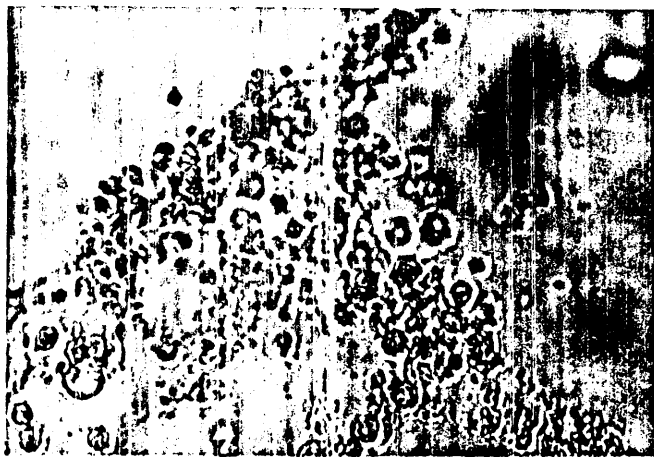


Fig. 13.- Fibroblastos de embrión de pollo 36 horas después de la infección con FPV (10^3 DICT)



Fig. 14.- Fibroblastos de embrión de pollo 48 horas después de la infección con FPV (10^3 DICT) (aumento 150 x)

y sufren una inactivación por la temperatura, determinamos la pérdida del poder citopático de los cuatro virus empleados (ND, FP, influenza y Sendai) determinando al mismo tiempo su poder hemaglutinante cuando manteníamos tales virus a una temperatura de 37° C en medios de mantenimiento a pH 7,2 (es normal al empezar los experimentos con cultivos celulares) y a pH 6 (final del medio de cultivo celular después de 96 horas tal y como habíamos observado previamente).

La Fig. 15 nos muestra los resultados obtenidos con el NDV. En ella observamos, en cuanto al poder infectivo, que éste disminuye dentro de las primeras 24 horas aproximadamente de 3 a 5 unidades logarítmicas a pH 7,2 mientras que la disminución es de 7 a 9 unidades logarítmicas a pH 6. La actividad infectiva medida por su poder citopático desaparece en 48 horas.

En cuanto al poder hemaglutinante del virus estudiado, observamos que éste sufre un descenso del título desde 128 unidades HA hasta 64 - 32 dentro de las 24 horas, permaneciendo constante a partir de este momento hasta el final del experimento.

El comportamiento de virus FP queda reflejado en la Fig. 16, en ella apreciamos que el poder infectivo sufre un descenso dentro de las primeras 24 horas, que es de 2 a 4 unidades logarítmicas a pH 7,2 y de 6 a 7,5 unidades a pH 6, observándose igualmente la inactivación completa a las 48 horas.

El título hemaglutinante sufre un descenso desde 512 unidades HA hasta 256-128 en la primera determinación, permaneciendo constante a partir de la misma.

ACCION DE LA TEMPERATURA (37°C) SOBRE EL PODER CITOPATICO Y
HEMAGLUTINANTE DEL NDV EN MEDIO (pH 7.2 y pH 6) SIN CELULAS

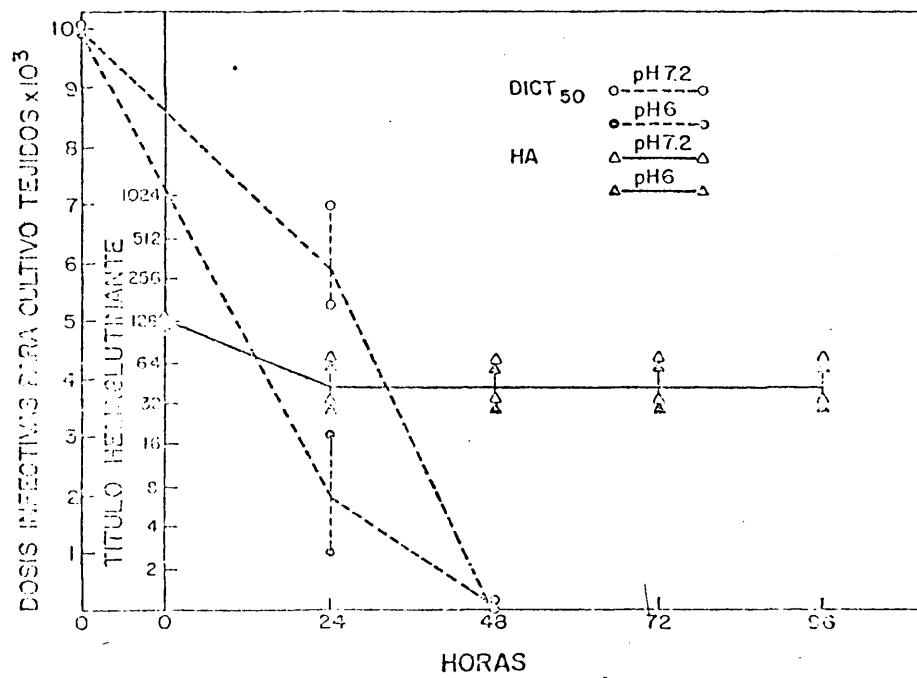


FIGURA 15

ACCION DE LA TEMPERATURA (37°C) SOBRE EL PODER CITOPATICO
Y HEMAGLUTINANTE DEL FPV EN MEDIO (pH 7.2 y pH6) SIN CELULAS

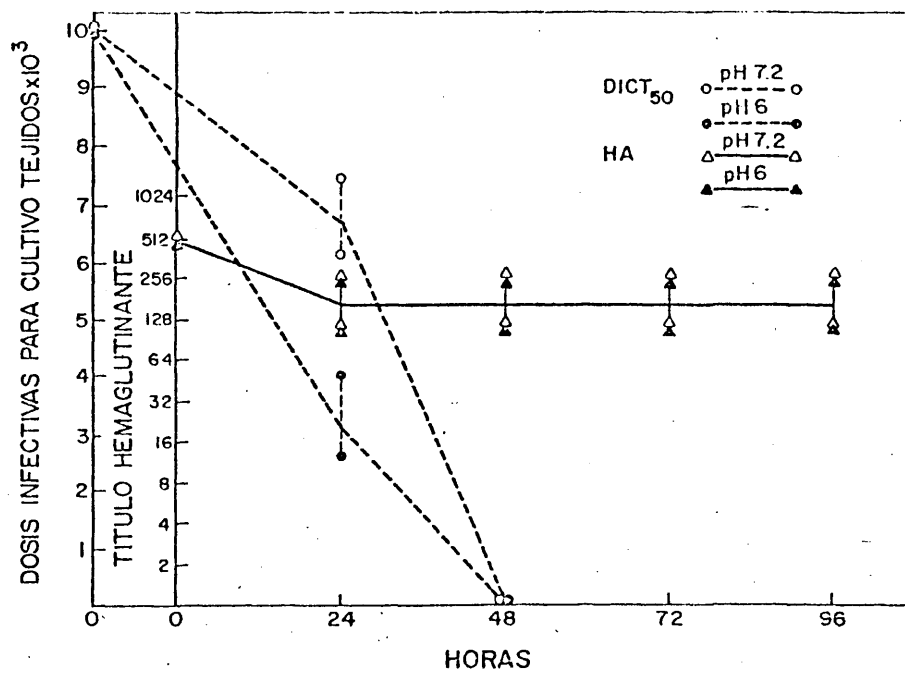


FIGURA 16

La Fig. 17 muestra los resultados obtenidos con el virus influenza, en ella observamos que el comportamiento viral es análogo en ambos pH, teniendo lugar un fuerte descenso del poder citopático dentro de las primeras 24 horas que es de unas 7,5 a 9,5 unidades logarítmicas. En este caso, también ocurre inactivación total a las 48 horas.

El título hemaglutinante fue de 64 unidades HA hasta 32 - 26 en la determinación efectuada a las 24 horas, permaneciendo después constante hasta el final del experimento.

Finalmente, la Fig. 18, en la que queda reflejado el comportamiento del virus Sendai, indica que este virus responde al experimento exactamente igual que lo hizo el NDV.

2. Inducción de interferón en pollo

Como se indica en el protocolo experimental estos estudios de inducción se han efectuado sobre células normales y en animales previamente sensibilizados por virus inactivados con el fin de conocer el posible efecto de estos tratamientos previos sobre la inducción de interferón; ello vendría a equivaler a una respuesta secundaria en un comportamiento inmunobiológico.

2.1. Inducción en condiciones normales

Para estas experiencias cabe considerar dos tipos de variables condicionadas por la naturaleza de la célula productora y del inductor, ya que como se puede ver en el Cuadro V hemos realizado experiencias "in vivo" sobre pollos e "in vitro" sobre fibroblastos y esplenocitos empleándose como inductores virus, endotoxinas y tilorona.

ACCION DE LA TEMPERATURA (37°C) SOBRE EL PODER CITOPATICO Y
HEMAGLUTINANTE DEL VIRUS INFLUENZA EN MEDIO (pH 7.2 y pH 5) SIN
CELULAS

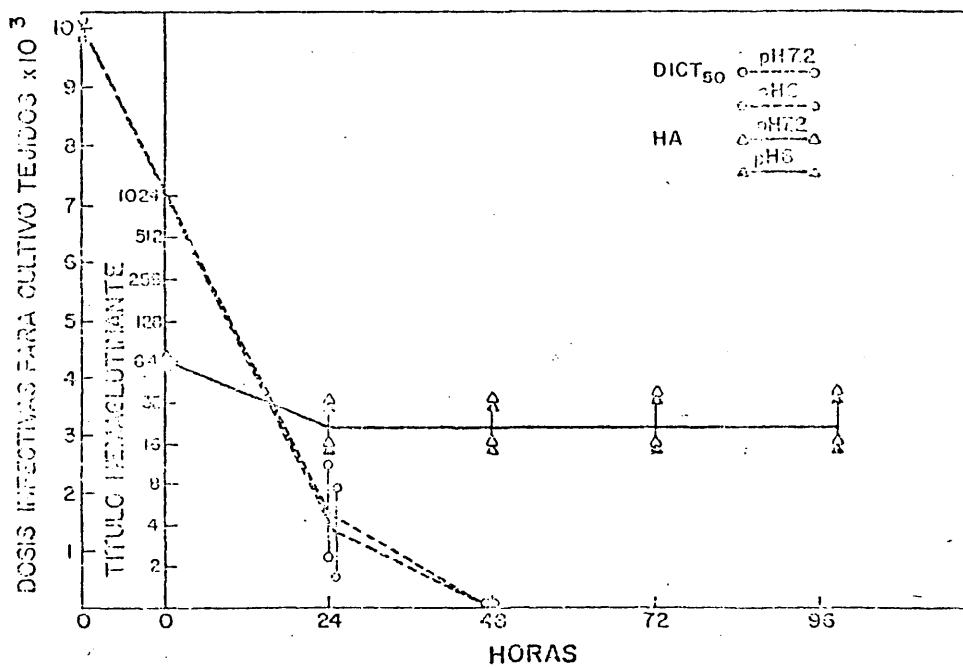


FIGURA 17

ACCION DE LA TEMPERATURA (37°C) SOBRE EL PODER CITOPATICO Y
HEMAGLUTINANTE DEL SENDAI EN MEDIO (pH 7.2 y pH6) SIN CELULAS

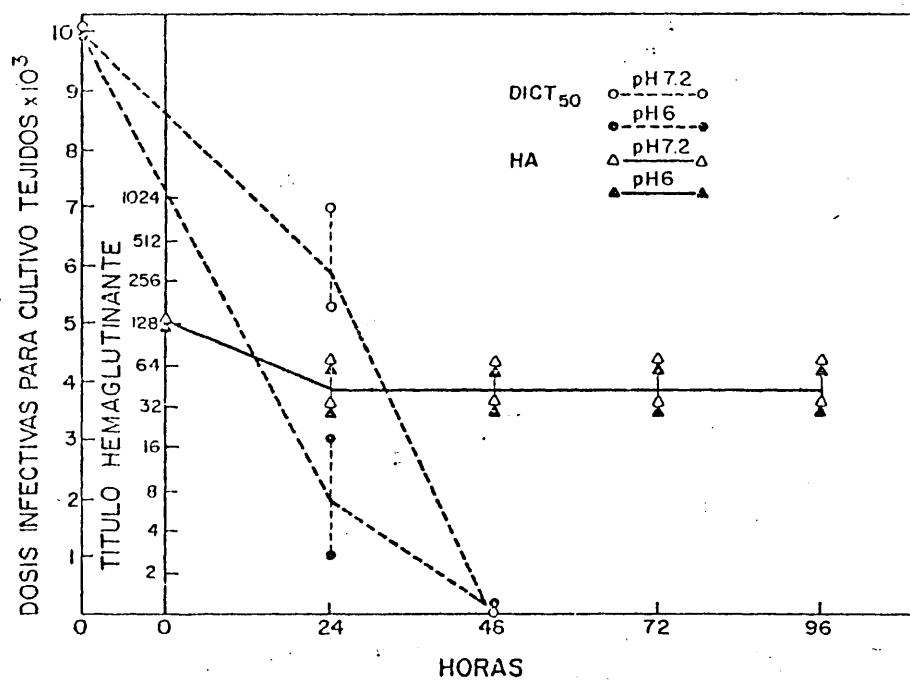


FIGURA 18

CUADRO V.- Títulos de inducción* de interferón en huesped aviar no sensibilizado

Tipo de inducción	"In vivo"		"In vitro"	
	Pollos	Fibroblastos	Esplenocitos	
VSV	90	no realizado 1200	no realizado 500	
NDV	1800			
P.aeruginosa ^a b	80 1000	760	320	
B. melitensis ^a b	74 800	680	240	
Por tilorona	3200	no realizado	no realizado	

Dosis LPS: a) 100 μ g/10 gr peso vivo y b) 1 μ g/10 gr peso vivo

* Las cifras representan U interferón 1 ml y son los valores medios de 15 a 25 experimentos, segun los casos.

Es preciso señalar que en la inducción con VSV y endotoxinas sobre pollos "in vivo" se obtuvieron títulos muy bajos; ello puede producirse por un lado por una débil capacidad inductora del virus, y por otro por el tipo de titulación empleado ya que se utilizó el método de valoración de disminución de la capacidad hemaglutinante de mixovirus multiplicados sobre M.C.A. según se puede ver en los Cuadros VI, VII y VIII y en las Figs. 19, 20, 21 y 22 que corresponden graficamente a los resultados obtenidos numericamente.

Tan sólo presentamos tres cuadros, como ejemplo, omitiendo otros nueve cuadros (reducción de la hemaglutinación de FPV, influenza y Sendai con los tres interferones obtenidos en cada inductor) por considerar suficientemente aclarado el tratamiento matemático llevado a cabo.

El Cuadro VI representa el título hemaglutinante alcanzado por el virus ND cuando el inductor de interferón es el VSV y observamos que el tanto por ciento de inhibición de la hemaglutinación va desde 99,55% hasta 45,55% para las diluciones 1/3 y 1/100, respectivamente, produciéndose en las diluciones intermedias valores que también son intermedios de inhibición.

A la vista de estos resultados hemos determinado a qué dilución corresponde el 75% de reducción en el título hemaglutinante, ya que según se mencionó en Material y Métodos, puede definirse como unidad interferón, la dilución de éste que es capaz de producir una reducción del 75% en el poder hemaglutinante, comparado con el control de virus sin tratar.

CUADRO VI.- Reducción en el poder hemaglutinante del NDV multiplicado en membrana corioalantoidea tratada con interferón (suero de pollo) inducido por VSV

Diluciones interferón	(a)						*	(a)						*	(a)						*	(b)	(c)	(d)	(e)
1/3	0	1	1	2	1	1	1,15	1	0	1	2	1	1	1,15	2	1	1	1	1	1,12	1,14	2,20	0,51	99,49	
1/5	2	2	3	2	3	2	2,29	2	2	3	2	3	3	2,45	3	1	2	2	3	2	2,04	2,26	4,76	1,10	98,90
1/10	3	4	3	5	4	2	3,36	3	4	4	3	4	5	3,77	5	2	4	4	4	3	3,53	3,55	11,61	2,68	97,32
1/30	6	5	4	6	6	6	5,44	6	5	5	4	6	5	5,12	6	5	5	5	6	6	5,48	5,35	40,27	9,29	90,71
1/50	7	6	7	8	6	5	6,43	8	5	7	7	6	6	6,43	5	5	7	6	8	8	6,38	6,41	83,75	19,32	80,68
1/100	10	8	7	7	6	8	7,57	10	9	8	8	7	6	7,89	10	9	8	7	7	8	8,10	7,85	226,46	52,24	47,76
Control NDV	10	10	8	8	9	8	8,79	10	9	9	8	9	9	8,89	10	10	8	8	9	7	8,60	8,79	433,51	100	0

* = Media geométrica del título hemaglutinante de los 6 tubos en cada determinación.

(a) = Títulos hemaglutinantes expresados en log₂

(b) = Media aritmética de los tres grupos

(c) = Transformación a antilog₁₀

(d) = Relación con el título HA - control

(e) = % reducción del título HA respecto a control de virus.

CUADRO VII.- Reducción en el poder hemaglutinante del NDV multiplicado en membrana corioalantoidea tratada con interferón (suero de pollo) inducido por IPS de B. melitensis

Diluciones interferón	(a)						*	(a)						*	(a)						*	(b)	(c)	(d)	(e)
1/3	5	6	6	4	5	6	5,28	7	5	5	6	6	5	5,62	7	6	6	5	7	5	5,04	5,61	48,19	10,23	89,77
1/5	7	6	7	8	6	5	6,43	8	5	7	7	6	6	6,43	5	5	7	6	8	8	6,30	6,41	83,75	17,78	82,22
1/10	7	8	8	7	6	8	7,29	8	9	7	8	7	7	7,63	7	8	7	7	8	8	7,48	7,47	174,10	36,98	63,02
1/30	9	8	8	7	9	9	8,30	9	8	8	7	9	7	7,96	8	8	9	9	8	8	8,32	8,19	286,42	60,81	39,19
1/50	10	9	8	8	9	9	8,81	10	9	9	8	9	9	8,81	10	8	8	9	9	9	8,81	8,81	439,54	93,32	6,68
1/100	10	9	9	8	9	8	8,81	10	9	8	8	9	9	8,81	10	10	8	8	9	9	8,96	8,86	454,99	96,60	3,40
Control NDV	10	9	8	9	9	8	8,81	10	10	8	9	9	8	8,96	10	10	9	9	8	8	8,96	8,91	470,98	100	0

* = Media geométrica del título hemaglutinante de los 6 tubos en cada determinación

(a) = Títulos hemaglutinantes expresados en log₂

(b) = Media aritmética de los tres grupos

(c) = Transformación a antilog₁₀

(d) = Relación con el título HA - control

(e) = % reducción del título HA respecto al control de virus

CUADRO VIII.- Reducción en el poder hemaglutinante del NDV multiplicado en membrana coricalantoidea tratada con interferón (suero de pollo) inducido por LPS de P. aeruginosa

Diluciones interferón	(a)				*	(a)				*	(a)				*	(b)	(c)	(d)	(e)						
1/3	2	3	3	4	3	2	2,75	4	4	3	2	3	4	3,24	3	2	2	3	3	2,62	7,26	1,58	98,42		
1/5	3	4	3	5	4	3	3,60	3	4	4	3	4	5	3,77	5	2	4	4	4	3	3,53	12,27	2,68	97,32	
1/10	4	5	5	6	4	5	4,78	5	5	6	6	5	5,48	6	7	5	6	5	5	5,62	5,29	38,64	8,43	91,57	
1/30	6	7	7	8	6	7	6,80	7	6	6	7	7	6	6,48	6	5	7	7	8	6	6,43	6,57	93,54	20,42	79,58
1/50	7	9	8	8	7	6	7,44	8	7	7	8	7	7	7,32	8	7	6	8	8	8	7,46	7,41	167,11	36,48	63,52
1/100	10	9	7	8	9	8	8,45	10	9	8	8	9	8	8,64	10	8	9	9	8	8	8,64	8,58	374,97	81,85	18,15
Control NDV	10	9	9	8	9	9	8,98	10	9	9	8	8	9	8,81	10	9	9	9	8	8	8,81	8,97	458,14	100	0

* = Media geométrica del título hemaglutinante de los 6 tubos en cada determinación

(a) = Títulos hemaglutinantes expresados en log₂

(b) = Media aritmética de los tres grupos

(c) = Transformación a antilog₁₀

(d) = Relación con el título HA - control

(e) = % reducción del título HA respecto al control de virus

El Cuadro VII recoge los títulos hemaglutinantes alcanzados por el NDV enfrentado al interferón inducido por LPS de B. melitensis y en él observamos que la unidad interferón (75% de reducción) corresponde a una dilución comprendida entre 1/5 y 1/10.

El Cuadro VIII representa igual determinación que las anteriores enfrentando el NDV al interferón inducido por LPS de P. aeruginosa. Observamos unos valores de inhibición que van desde 98,16% a 17,59% para las diluciones 1/3 y 1/100 respectivamente. Así, observamos que la reducción 75% está localizada entre las diluciones 1/30 y 1/50 que determinaremos en el cuadro correspondiente.

Las figuras que siguen representan la reducción del título hemaglutinante de los virus ND (Fig. 19), Sendai (Fig. 20) FP (Fig. 21) e influenza (Fig. 22) multiplicados en M.C.A., enfrentados con distintas diluciones de interferón inducido por VSV y los LPS procedentes de B. melitensis y P. aeruginosa y la localización de la dilución correspondiente al 75% de reducción en el título hemaglutinante como ya hemos explicado en la literatura sobre los cuadros anteriormente presentados.

En la Fig. 19, frente al NDV, encontramos la unidad interferón a las diluciones 1/59,9, 1/5,1 y 1/22,9 para el VSV, LPS de B. melitensis y LPS de P. aeruginosa, respectivamente

Igualmente en la Fig. 20 con el virus Sendai, aparece 1 unidad interferón en las diluciones 1/42,4, 1/5,1 y 1/33,2 para los inductores antes mencionados y en el mismo orden.

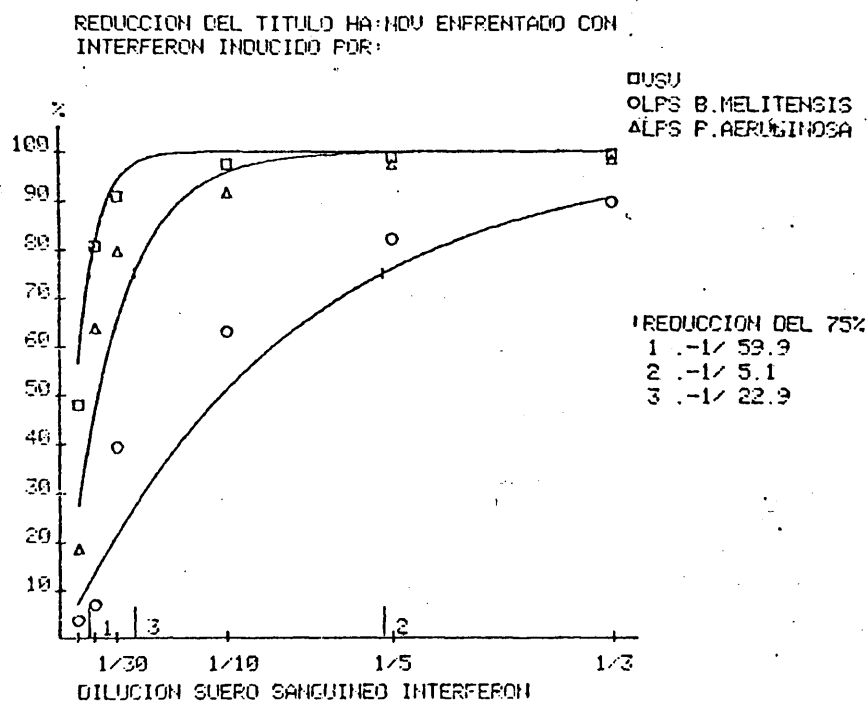


Fig. 19.- Determinación de la U interferón por el método de disminución de la actividad hemaglutinante del virus ND.

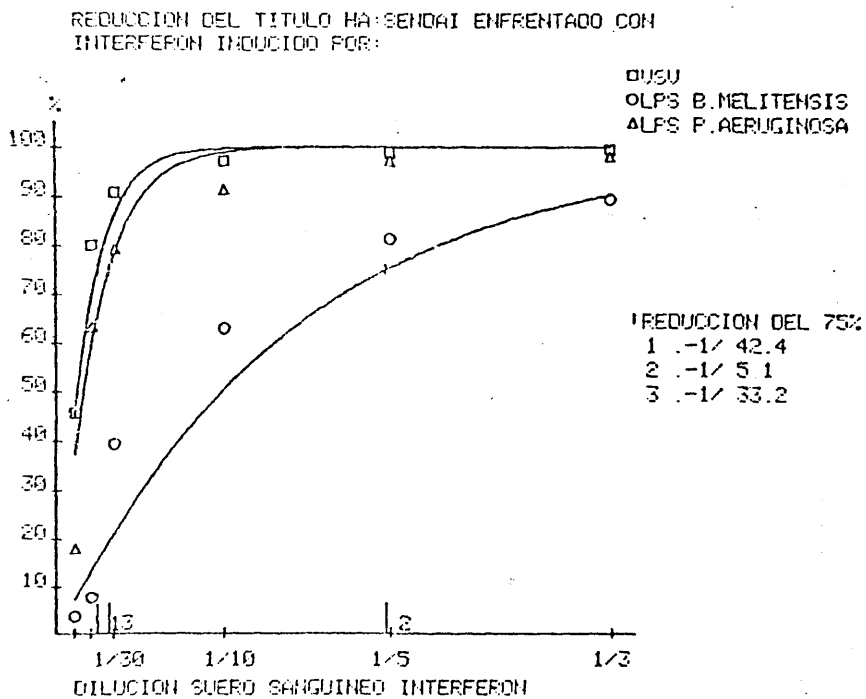


Fig. 20.- Determinación de la U interferón por el método de disminución de la actividad hemaglutinante del virus Sendai.

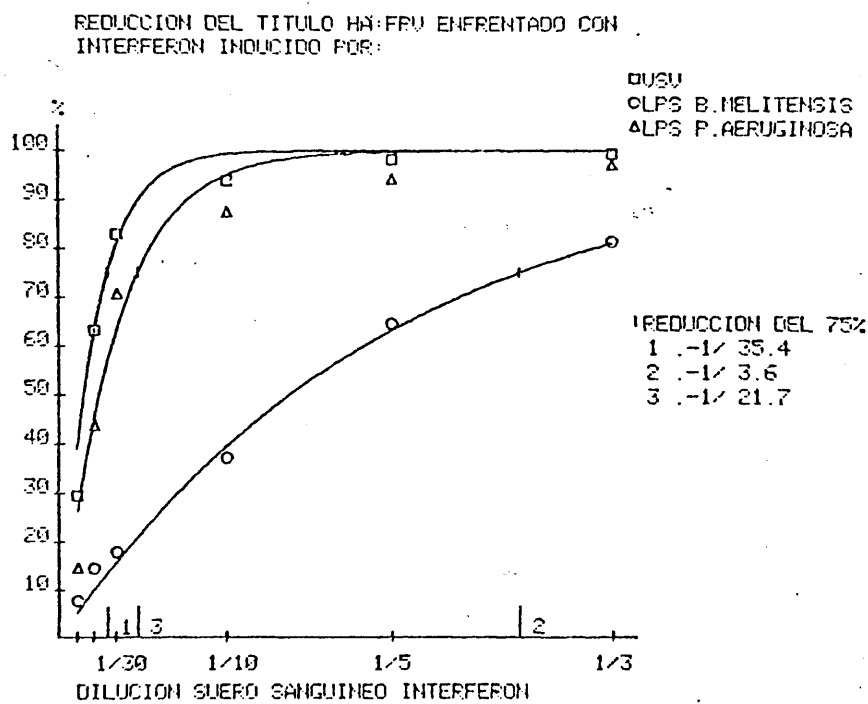


Fig. 21.- Determinación de la U interferón por el método de disminución de la actividad hemaglutinante del virus FP.

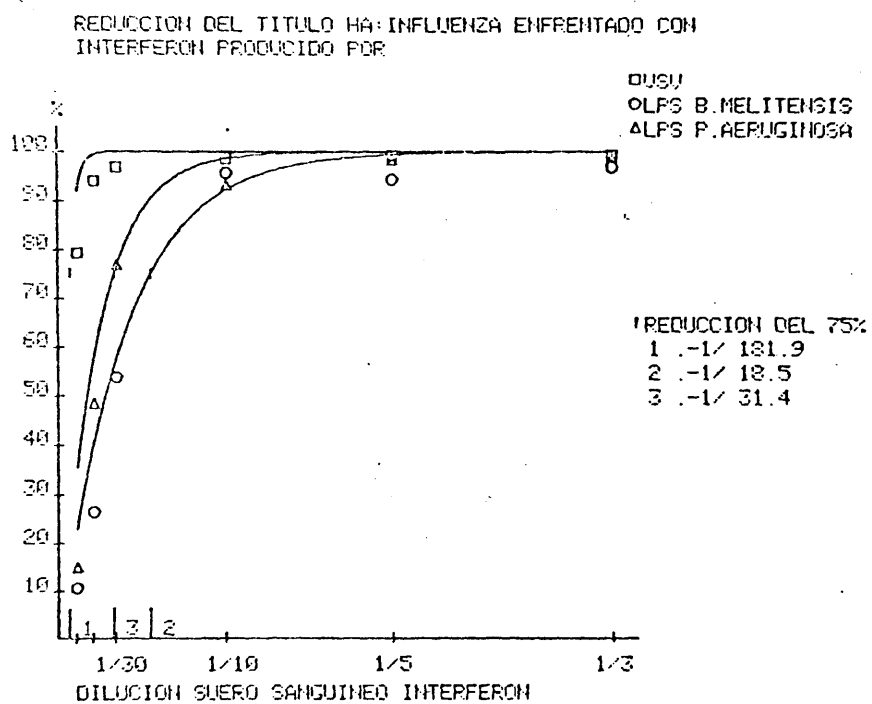


Fig. 22.- Determinación de la U interferón por el método de disminución de la actividad hemaglutinante del virus influenza.

Por otra parte y para el FPV, Fig. 21, encontramos las diluciones 1/35,4, 1/3,6 y 1/21,7 donde aparecen las respectivas unidades interferones de los tres inductores habituales en nuestro trabajo y en el orden ya expresado.

Para terminar, en la Fig. 22 y con el virus influenza, hemos determinado las diluciones 1/181,9, 1/18,5 y 1/31,4 como aquellas que contienen la unidad interferón buscada para cada inductor de interferón estudiado*.

Una vez conocidos los resultados de todos estos experimentos previos pareció obligatorio utilizar en los sucesivos ensayos NDV como agente inductor viral y dosis más altas de endotoxinas (1 μ g en lugar de 100 ng) y acudir a los métodos "in vitro" como el tantas veces citado de Dulbecco. Presentamos en las Figuras 23, 24, 25 y 26 algunos ejemplos de marcas infectivas obtenidas utilizando dicha técnica. Los interferones obtenidos por este método fueron concentrados por Carbovax o a través de membranas de Amicón hasta alcanzar títulos de 500, 1.000 y 2.500 U interferón que precisábamos para experiencias sucesivas.

2.2. Inducción en células sensibilizadas

Con este propósito estudiamos la inducción "in vitro" sobre esplenocitos procedentes de pollos previamente sensibilizados "in vivo" con NDV o FPV, inactivados con BPL, y con 1, 2,

* Las Fig. 19 a 22 han sido obtenidas utilizando un ordenador PPD-11/10 con pantalla TEKTRONIX 4010-1, Hard Copy Unit 4631

** Agradezco a mi marido D. Santiago Romero Vives por la realización de las gráficas obtenidas en ordenador PPD-11/10

Marcas infectivas sobre fibroblastos según la técnica de Dulbecco para la titulación de interferón inducido, en este caso, por NDV; utilizando el VS como virus interferido

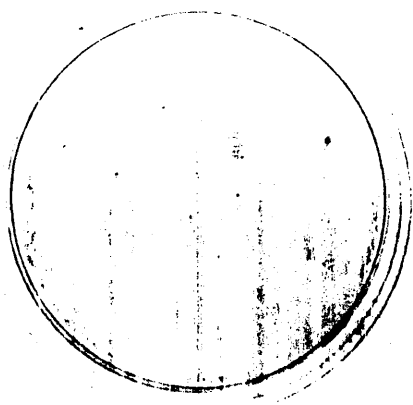


Fig. 23.- Testigo de fibroblastos infectados con VSV pero sin tratar con interferón.

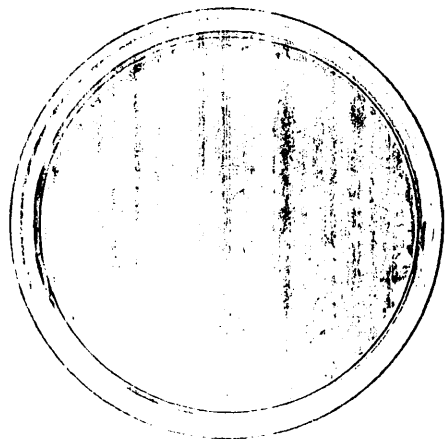


Fig. 24.- Reducción en el número de marcas infectivas por la acción de una determinada dilución de interferón.



Fig. 25.- Reducción en el número de marcas infectivas por la acción de una determinada dilución de interferón distinta de la utilizada en la figura 24.

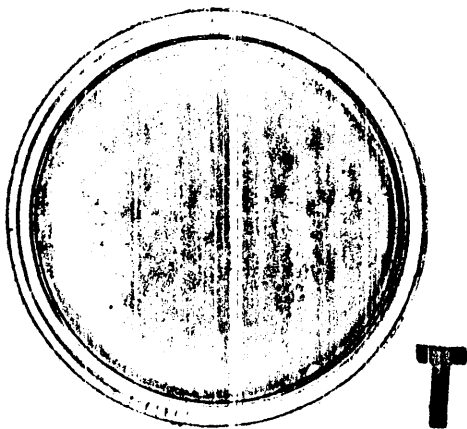


Fig. 26.- Testigo de células no infectadas

3 ó 4 dosis de sensibilización en intervalos semanales. Este tipo de experimentos se realizan utilizando como virus estimulantes inductores las mismas cepas NDV y FPV que habían sido termoinactivadas (Fig. 27) o no (Fig. 28).

Como se puede ver en estos resultados hemos acudido a realizar inducciones cruzadas con el objeto de tener una idea de la interrelación que existe entre ambos tipos de virus (para-u orthomixovirus) en su papel de inductores. Llama la atención la potenciación que se alcanza cuando se emplean como estimulantes de la inducción los virus termoinactivados, obteniéndose siempre títulos más altos cuando se utilizan los virus homólogos al que sirvió para la sensibilización estando en relación directa con el número de dosis sensibilizantes.

A la vista de estos resultados consideramos de gran interés conocer el posible efecto estimulador de los agentes virales sobre los esplenocitos de pollos sensibilizados con FPV y NDV enfrentando estos esplenocitos así sensibilizados, con FPV e influenza (orthomixovirus), con NDV y Sendai (paramixovirus), añadiendo a la prueba un virus completamente ajeno como es el encefalítico equino Este (arbovirus). En el Cuadro IX (correspondiente a la tercera dosis sensibilizante) observamos el efecto de los antígenos virales sobre esplenocitos de pollo sensibilizados con NDV y FPV inactivados comprobando que la Con A produce estimulaciones mayores que la PHA tanto para esplenocitos sensibilizados con NDV y con FPV, como para testigos sin sensibilizar. Los valores testigo sin estimulante son casi iguales para los tres grupos.

INDUCCION DE INTERFERON SOBRE ESPLENOCITOS AVIARES PROCEDENTES DE:

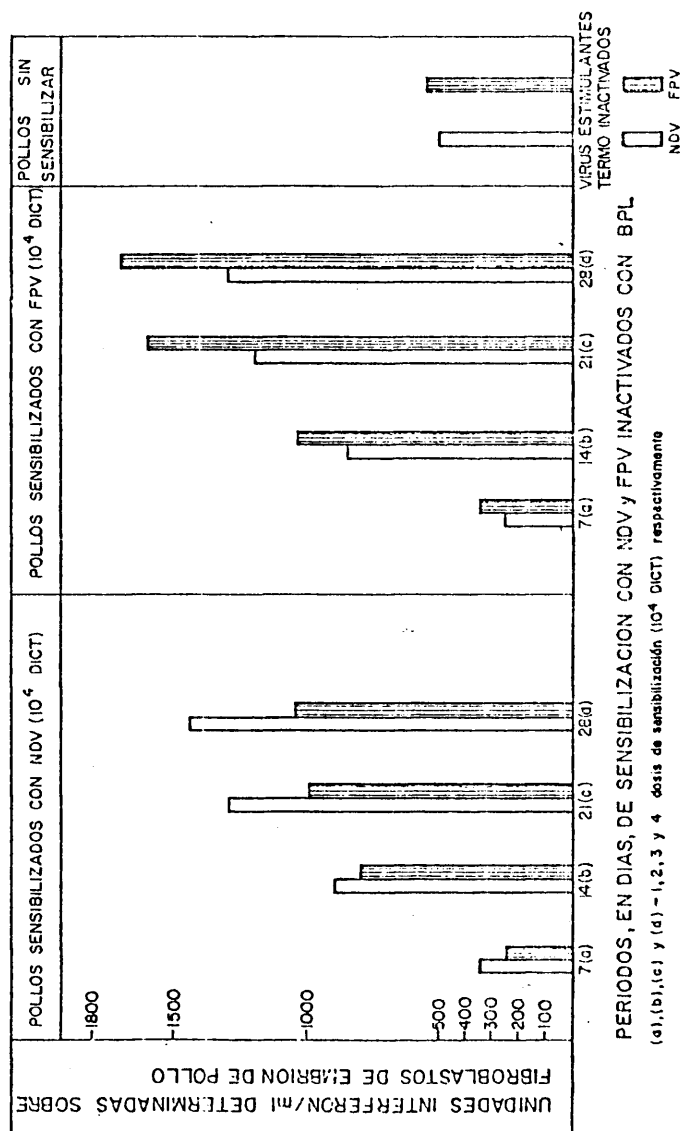


FIGURA 27

INDUCCION DE INTERFERON SOBRE ESPLENOCITOS AVIARES PROCEDENTES DE:

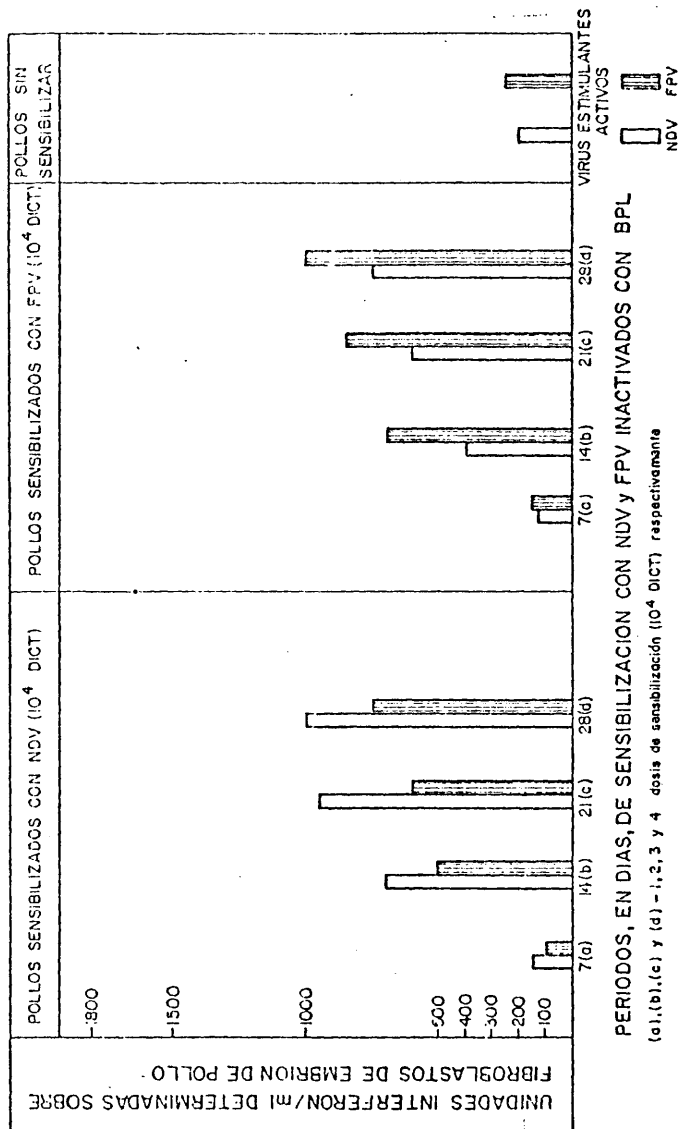


FIGURA 28

C U A D R O IX

EFFECTO DE VARIOS ANTIGENOS VIRALES SOBRE ESPLENOCITOS DE POLLOS INMUNIZADOS CON NDV Y FPV INACTIVADOS

VIRUS ESTIMULANTES	ESPLENOCITOS POLLO SENSIBILIZADOS POR		ESPLENOCITOS POLLO	
	NDV	FPV	CONTROL SIN SENSIBILIZAR	
	Incorporación de ^3H -timidina cpm / 200 μl (media \pm DS)			
NDV	ACTIVO	1780 \pm 85	1320 \pm 60	
	INACTIVO	2320 \pm 115	1450 \pm 77	
FPV	ACTIVO	7470 \pm 180	890 \pm 59	
	INACTIVO	9650 \pm 510	710 \pm 40	
FLU	ACTIVO	3370 \pm 380	990 \pm 70	
	INACTIVO	5090 \pm 221	1210 \pm 63	
SENDAI	ACTIVO	2800 \pm 120	1200 \pm 67	
	INACTIVO	3310 \pm 174	1013 \pm 58	
ESTE	ACTIVO	1820 \pm 106	870 \pm 50	
	INACTIVO	1950 \pm 98	1020 \pm 66	
TESTIGOS				
PHA - 3 μg		2850 \pm 164	3000 \pm 178	
CON - A 1 μg		8100 \pm 620	7210 \pm 341	
SIN ESTIMULANTE		1540 \pm 83	1430 \pm 78	
PULSO DE TIMIDINA: 0.5 μC en 200 μl				
ESPLENOCITOS: 5×10^6 /ml				
VIRUS ESTIMULANTES: NDV, FPV, FLU y SENDAI 10^3 DICT (fibroblastos), EEE 10^2 DL (raón)				

Por otra parte, observando los valores indicados de la parte superior del cuadro encontramos cifras en caracteres diferentes; los subrayados corresponden a la estimulación homotípica pura (NDV para NDV y FPV para FPV) y otros sin subrayar que podemos considerar homotípica simple (Sendai para NDV paramixovirus; influenza para FPV- orthomixovirus). Para la estimulación homotípica pura nos encontramos, dentro de valores más altos que en el resto, con la diferencia de que el estimulante NDV atenuado origina una mayor incorporación de ^3H -timidina (6 veces) que cuando actúa en estado activo (1,7 veces) en relación a los controles sin sensibilizar; otro tanto sucede con el homotípico simple Sendai (5,2 y 1,5). La reacción heterotípica con los orthomixovirus ha dado estimulaciones que varían entre 3,4 a 1,7, pero estos valores no son muy demostrativos, dado que el EEE ha dado valores de 2. Si examinamos los valores de FPV nos encontramos estimulaciones homotípicas puras de 13,5 y 8,5 (virus inactivado y virus activo), la simple de 4,2 a 3,4 (influenza inactivado y activo) sucediendo con los virus heterotípicos y con el EEE lo mismo que ocurre en el caso de NDV.

2.2.1. Pruebas de neutralización cruzada entre NDV y FPV en células sensibilizadas

Finalmente, como una experiencia complementaria, para conocer el grado de sensibilización de los esplenocitos aviarios por estos virus (ND y FP) y para determinar su comportamiento ante el poder infectivo de ambos virus cuando se determina este poder tomando como inóculo infectivo el medio de mantenimiento del cultivo después de centrifugación y determinándola sobre fibroblastos la DICT_{50} . En este caso, se realizaron también experiencias cruzadas de cuyos resultados obtenidos

da idea la Fig. 29 en la cual quedan reflejadas las $DICT_{50}$ sobre fibroblastos de embrión de pollo. En la parte de la derecha de la figura que nos ocupa vemos que el virus se ha multiplicado hasta valores por encima de 1 log. con arreglo al inóculo inicial; mientras que en el centro e izquierda, que corresponden a valores obtenidos sobre esplenocitos sensibilizados con FPV y con NDV respectivamente, nos encontramos que una dosis de sensibilización (7 días) no impide la multiplicación del virus tanto homólogo como heterólogo, en tanto que 2 dosis (14 días) dan lugar a valores más bajos que el del inóculo. En la parte central del histograma, a partir, de 3 dosis de FPV (21 días), se observa una neutralización completa del virus medido, mientras que el NDV continúa presentando valores superiores al inóculo. En la parte de la izquierda sucede lo mismo pero con relación al NDV, mientras que el FPV continúa en altos valores infectivos.

3. Inducción de interferón en ratón

Con propósitos comparativos entre dos especies animales, cuya organización del sistema inmune es diferente, hemos realizado sobre ratón el mismo tipo de experiencias anteriormente descritas. También en este caso seguimos la misma pauta señalada en el protocolo para conocer el efecto de la sensibilización previa con virus activo de los animales donadores de los esplenocitos.

3.1. Inducción en condiciones normales

En primer lugar determinamos los niveles de inducción tanto "in vitro" como "in vivo" utilizando como inductores NDV, endotoxinas y tilorona. De los resultados obtenidos da idea el Cuadro X

NEUTRALIZACIÓN DE FPV Y NDV EN CULTIVOS DE ESPLENOCITOS AVIARES PROCEDENTES DE POLLOS SENSIBILIZADOS CON ESTOS VIRUS

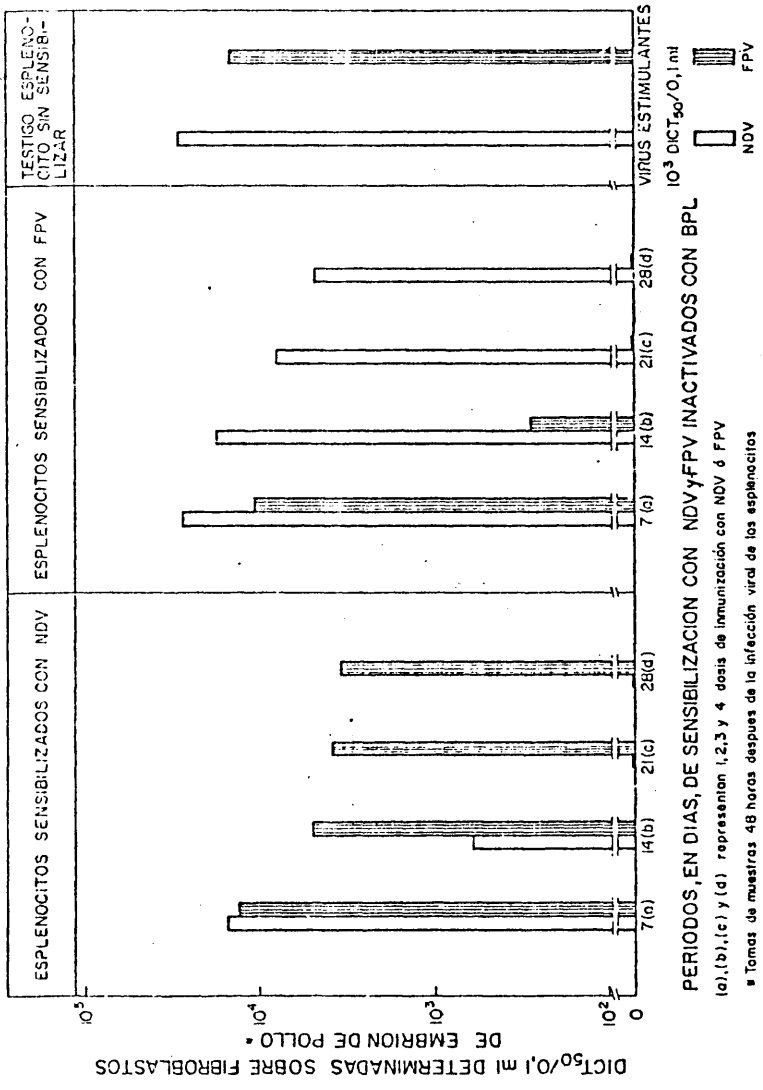


FIGURA 29

CUADRO X.- Títulos de inducción* de interferón en huesped murino no sensibilizado

Tipo de inducción	In vivo		In vitro	
	Ratones	Células L	Esplenocitos	
Por NDV	2.400	2.000	600	
Por LPS de:				
<u>P. aeruginosa</u>	1.300	980	400	
<u>B. melitensis</u>	1.100	800	300	
Por tilorona	5.000	no realizado	no realizado	

* Las cifras representan U interferón/1 ml y son los valores medios de 15 a 25 experimentos

3.2. Inducción previa sensibilización por NDV y FPV

Al igual que en pollos, también quisimos comprobar el efecto de la virus sensibilización previa para la inducción de interferón en esplenocitos con virus estimulantes inductores termoinactivados (Fig. 30) o no (Fig. 31).

En la Figura 30 observamos que, comparando con los controles una dosis única de sensibilización (tanto con NDV como con FPV) conduce a una respuesta interferón ligeramente inferior a la alcanzada cuando los ratones no han sido sensibilizados. El número de unidades interferón determinadas ha aumentado progresivamente en relación directa con las dosis de sensibilización, comprobando que los valores son casi tres veces mayores cuando se trata de esplenocitos procedentes de animales sensibilizados con el virus homólogo, si bien estos valores son también altos para el heterólogo en comparación con los valores obtenidos en esplenocitos sin sensibilizar.

Cuando estudiamos la inducción de interferón sobre esplenocitos murinos procedentes de ratones sensibilizados con NDV y FPV, empleando virus estimulantes activos vemos que los resultados son paralelos -aunque ligeramente inferiores- a los obtenidos con estimulantes termoinactivados; pudiéndose observar que aparecen valores del doble de unidades, especialmente cuando se trata de esplenocitos procedentes de animales sensibilizados con el virus homólogo. Utilizando como estimulante virus inactivado o no, siempre se ha obtenido un mayor rendimiento en interferón utilizando como inductor estimulante el virus que sirvió como sensibilizante.

UNIDADES INTERFERON MI DETERMINADAS SOBRE CELULAS L 929		RATONES SENSIBILIZADOS CON NDV (10^4 DICT)		RATONES SENSIBILIZADOS CON FPV (10^4 DICT)		RATONES SIN SENSIBILIZAR			
		7(a)	14(b)	21(c)	28(d)	7(a)	14(b)	21(c)	28(d)
1500									
1000									
500									
400									
300									
200									
100									

PERIODOS, EN DIAS, DE SENSIBILIZACION CON NDV y FPV ACTIVOS
(a), (b), (c) y (d) - 1, 2, 3 y 4 dosis de sensibilización (10^4 DICT) respectivamente

VIRUS ESTIMULANTES
NDV FPV

200.

INDUCCION DE INTERFERON SOBRE ESPLENOCITOS MURINOS PROCEDENTES DE:

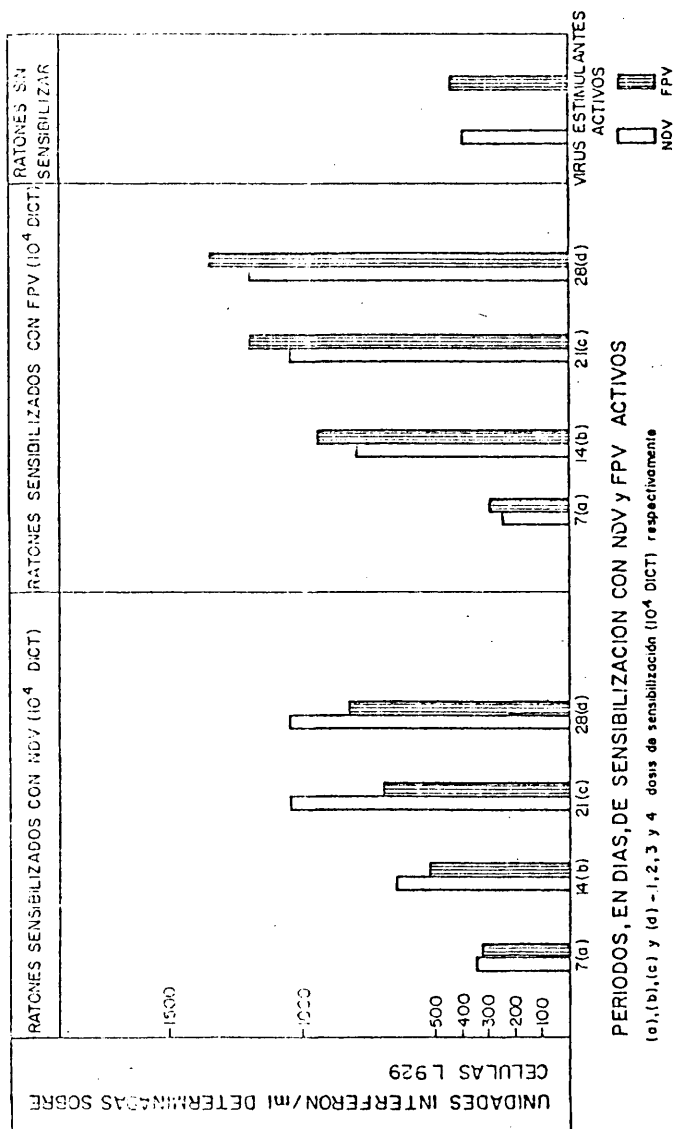


FIGURA 31

Por último en este grupo de ensayos también se ha comprobado el efecto de la sensibilización viral previa sobre esplenocitos de ratón, utilizando como estimulante orthomixovirus (FPV e influenza) y paramixovirus (NDV y Sendai) y arbovirus (EEE). Los resultados obtenidos se expresan en el Cuadro XI, donde observamos que, la Con A origina valores mas altos que la PHA tanto en esplenocitos sensibilizados con NDV y FPV, como con testigos sin sensibilizar. Así empleando los mismos caracteres tipográficos y subrayando como se hizo en el Cuadro IX (correspondiente a la tercera dosis sensibilizante) para señalar las diferencias comprobamos haciendo una relación con los valores obtenidos en esplenocitos sin sensibilizar, que la sensibilización homotípica pura para NDV de valores de 28 y 25, y para la homotípica simple de 16 a 6,5, siempre a favor de los virus estimulantes activos mientras que para la heterotípica encontramos valores extremos entre 11,7 (influenza activo) y 4 (FPV inactivado) con valores siempre por debajo del 1,5 para EEE.

En cuanto al FPV podemos observar sensibilizaciones homotípicas puras de 16,7 y 10 (para activo e inactivado respectivamente) y para la simple de 11,7 y 7,5; este también a favor de los virus estimulantes activos, mientras que para la heterotípica encontramos valores de 7,5 (NDV activo) y 4,1 (NDV inactivado) y para el Sendai activo de 5 frente al valor 4 del inactivado; en cuanto se refiere al virus EEE aparecen valores siempre por debajo de 1,4.

EFFECTO DE VARIOS ANTIGENOS VIRALES SOBRE ESPLENOCITOS DE RATONES INMUNIZADOS CON NDV Y FPV ACTIVOS

VIRUS ESTIMULANTES	ESPLENOCITOS RATON SENSIBILIZADOS CON		ESPLENOCITOS RATON	
	NDV	ACTIVO	FPV	SIN SENSIBILIZAR
	Incorporación de ^3H - timidina cpm / 200 μl (media \pm DS)			
NDV	ACTIVO	50422 \pm 2540	13400 \pm 840	1790 \pm 110
	INACTIVO	29700 \pm 1810	8100 \pm 637	1963 \pm 147
FPV	ACTIVO	12760 \pm 637	39200 \pm 1160	2375 \pm 205
	INACTIVO	9000 \pm 480	24971 \pm 1083	2420 \pm 210
FLU	ACTIVO	12180 \pm 1432	21430 \pm 1112	1040 \pm 60
	INACTIVO	8730 \pm 479	13310 \pm 784	1160 \pm 65
SENDAI	ACTIVO	36630 \pm 2865	11780 \pm 680	2321 \pm 170
	INACTIVO	14180 \pm 1284	8800 \pm 522	2167 \pm 149
ESTE	ACTIVO	3100 \pm 130	2631 \pm 138	2483 \pm 220
	INACTIVO	2800 \pm 140	2900 \pm 150	2110 \pm 198
INERTOS	PHA - 3 μg	11902 \pm 870	12430 \pm 714	10910 \pm 733
	CON - A 1 μg	14177 \pm 1010	16196 \pm 827	15385 \pm 820
SIN ESTIMULANTE		2480 \pm 220	3024 \pm 260	2577 \pm 1040
PULCO DE TIMIDINA: 0.5 μCi en 200 μl ESPLENOCITOS : 5×10^6 /ml VIRUS ESTIMULANTES: NDV, FPV, FLU y SENDAI 10^3 DICT (Librotesis), EE $\pm 10^2$ DL (ratón)				

4. Acción del interferón "in vivo" sobre la respuesta inmune en pollo y ratón

Este estudio se realiza a dos niveles según que los datos se refieran a las fases previas de la inmunorespuesta (blastogénesis) o a los estudios finales mediante determinación de células formadoras de IgM, ambos sobre pollo y ratón con el fin de poder conseguir un criterio comparativo.

En el primer caso, a partir de los bazo de los animales inmunizados primariamente con SRBC y que habían recibido, o no tratamiento con distintas dosis de interferón, se prepararon las suspensiones de esplenocitos para someterlas al proceso de estimulación blastogénica con PHA y Con A.

En estas condiciones se estudiaron las variaciones en la incorporación de ^3H -timidina producidas por distintos tratamientos previos de interferón desde 20 a 2 días antes de la inmunización primaria con SRBC. En las figuras que siguen se recogen los resultados obtenidos con pollos sometidos a tratamiento con interferón inducido por NDV (Fig. 32) o por endotoxinas de B. melitensis (Fig. 33) y de P. aeruginosa (Fig. 34).

La Figura 32 muestra por una parte que la estimulación blastogénica está mas favorecida cuando el mitógeno empleado es la Con A, si bien, los resultados son proporcionales para ambos mitógenos. Observamos que siendo siempre los valores mas bajos que los obtenidos en testigos, para las tres dosis estudiadas 500, 1.000 y 2.500 U interferón/10 gr de peso vivo, aparece una mayor blastogénesis con 500 unidades interferón siendo el valor menor el correspondiente a las 2.500 U interferón den-

EFFECTO SOBRE LA BLASTOGENESIS DE ESPLENOCITOS PROCEDENTES DE POLLOS TRATADOS CON INTERFERON EXOGENO INDUCIDO POR NDV

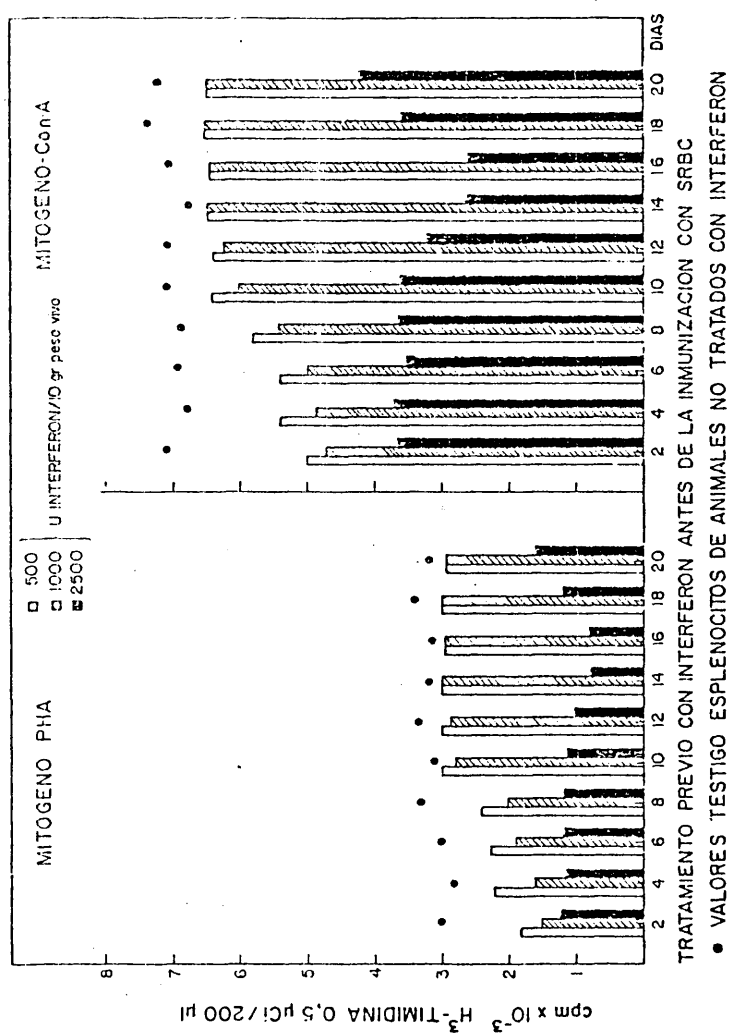
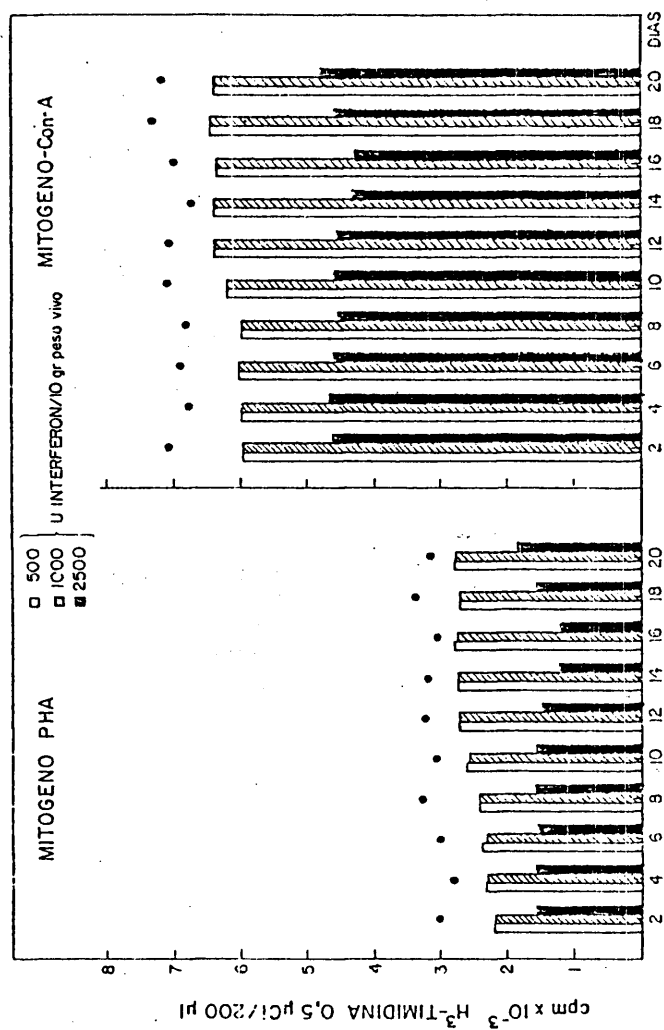


FIGURA 32

EFFECTO SOBRE LA BLASTOGENESIS DE ESPLENOCITOS PROCEDENTES DE POLLOS TRATADOS CON INTERFERON EXOGENO INDUCIDO POR LPS DE *B. MELITENSIS*



TRATAMIENTO PREVIO CON INTERFERON ANTES DE LA INMUNIZACION CON SRBC
• VALORES TESTIGO ESPLENOCITOS DE ANIMALES NO TRATADOS CON INTERFERON

FIGURA 33

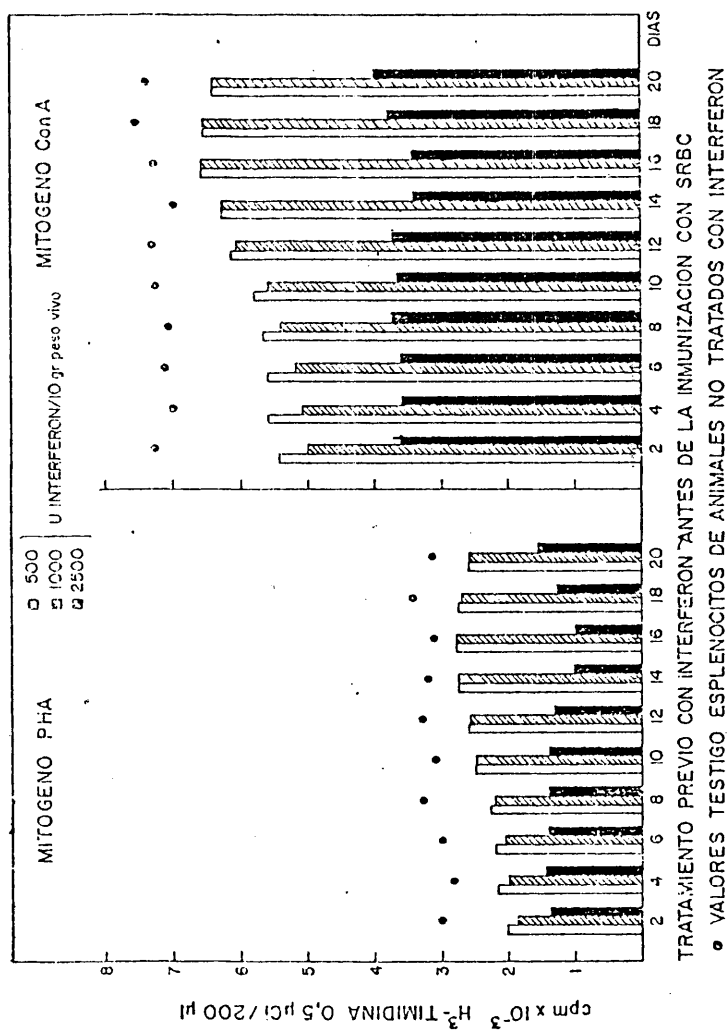


FIGURA 34

tro de las 6 primeras determinaciones, pues las dosis 500 y 1.000 U interferón igualan su acción sobre la blastogénesis a partir del día 14 de intervalo de administración entre interferón y SRBC. En cuanto a los días de tratamiento vemos que a intervalos cortos de tiempo entre administración de interferón e inmunización, desde 2 hasta 10 días, los valores de incorporación de timidina se acercan según aumenta el intervalo de tratamiento, a partir del día 10 y hasta el final del experimento, día 20, la cantidad de ^3H -timidina incorporada adquiere un valor máximo y aproximadamente igual para cada una de las concentraciones de interferón empleadas. La dosis 2.500 U interferón presenta un valor de blastogénesis muy similar dentro de los 10 primeros días de intervalo para sufrir un ligero descenso entre los 14 y 16 días y una recuperación, con valores similares a los primeros mencionados, en los dos últimos intervalos de 18 y 20 días independientemente de la lectina empleada.

La Fig. 33 indica también una mayor blastogénesis con el mitógeno Con A, aunque como en el caso anterior, podemos decir que los resultados expresados a ambos lados del cuadro son superponibles proporcionalmente. Teniendo en cuenta esta observación comprobamos que en esta ocasión a las dosis 500 y 1.000 U interferón les corresponden, salvo muy ligera excepción, la misma cantidad de ^3H -timidina incorporada, siendo la dosis 2.500 U interferón la que proporciona valores menores. Con respecto a los días de intervalo de tratamiento entre administración de interferón e inmunización observamos que en este caso hay un ligero aumento progresivo entre el intervalo 1 y 12 a partir del cual los valores permanecen mas o menos iguales.

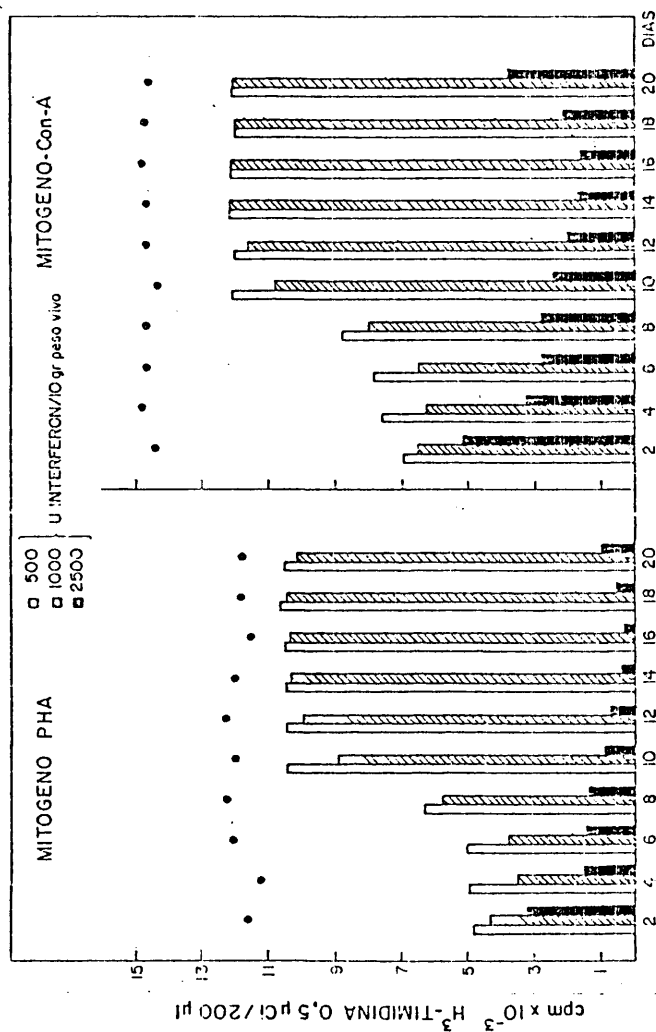
Finalmente con el interferón inducido por LPS de P. aeruginosa, Fig. 34, vemos que el mitógeno Con A da lugar a valores mayores de blastogénesis que la PHA; que la dosis 500 U interferón alcanza también niveles mayores que las otras dos dosis aunque se iguala con la de 1.000 U interferón a partir del día 10 para el mitógeno PHA y del día 14 para la Con A y que también en este caso, con respecto a los días de intervalo de tratamiento recibido, hay un aumento lento y progresivo de incorporación de ^3H -timidina hasta que en el día 14 aproximadamente se llega a un valor de blastogénesis máximo y constante hasta el final del experimento.

Igualmente se realizaron este tipo de experimentos con esplenocitos de ratón y en las Figs. 35, 36 y 37 se detallan los resultados obtenidos en presencia de interferón exógeno obtenido con los mismos inductores anteriormente citados

En la Fig. 35, se presentan los resultados alcanzados con el interferón inducido por el NDV. También en este caso el mitógeno Con A alcanza valores mayores de blastogénesis que el PHA. Respecto al resto de la gráfica, los resultados son proporcionales, se alcanza el mayor número de cuentas cuando el tratamiento con interferón tiene lugar 10 días antes de la inmunización manteniéndose constante a partir de este momento hasta el día 20 de administración. Las cuentas son mayores cuando la dosis administrada es de 500 U interferón /10 gr de peso vivo, siendo la menor la correspondiente a las 2.500 U interferón.

En el periodo comprendido entre 2 y 10 días, la blastogénesis va aumentando según se distancia el tratamiento interferón - SRBC.

EFFECTO SOBRE LA BLASTOGENESIS DE ESPLENCITOS PROCEDENTES DE RATONES
TRATADOS CON INTERFERON EXOGENO INDUCIDO POR NDV



TRATAMIENTO PREVIO CON INTERFERON ANTES DE LA INMUNIZACION CON SRBC
• VALORES TESTIGO ESPLENCITOS DE ANIMALES NO TRATADOS CON INTERFERON

FIGURA 35

La Fig. 36 que resume los resultados alcanzados cuando el interferón es el inducido por LPS de B. melitensis muestra que también en este caso la blastogénesis es mayor cuando el mitógeno utilizado es la Con A, siendo proporcionales los resultados para ambos. En esta ocasión, los valores aumentan paulatinamente entre 4 y 10 días alcanzando el máximo valor en este momento y manteniéndose más o menos constante hasta el último día de la administración.

Las dosis administradas muestran una diferencia de cuentas claramente manifiesta hasta el día 8 de tratamiento, sobre todo en el caso de las 2.500 U interferón, sin embargo, a partir del día 10, las dosis 500 y 1.000 U interferón se igualan prácticamente en su acción sobre la blastogénesis.

Cuando el interferón es el procedente de LPS de P. aeruginosa y como en los casos anteriores, la blastogénesis es mayor cuando el mitógeno es la Con A. Por otra parte, como observamos en la Fig. 37, también encontramos a partir del día 4 y hasta el 10, un aumento progresivo del número de cuentas, que se mantiene constante hasta el final del experimento.

Al igual que con el LPS procedente de B. melitensis, las dosis 500 y 1.000 U interferón se igualan prácticamente a partir del día 14 de tratamiento, sin embargo, la de 2.500 U interferón arroja unos valores bastante inferiores a los alcanzados por las otras dosis citadas.

EFFECTO SOBRE LA BLASTOGENESIS DE ESPLENOCITOS PROCEDENTES DE RATONES
TRATADOS CON INTERFERON EXOGENO INDUCIDO POR LPS DE B.MELITENSIS

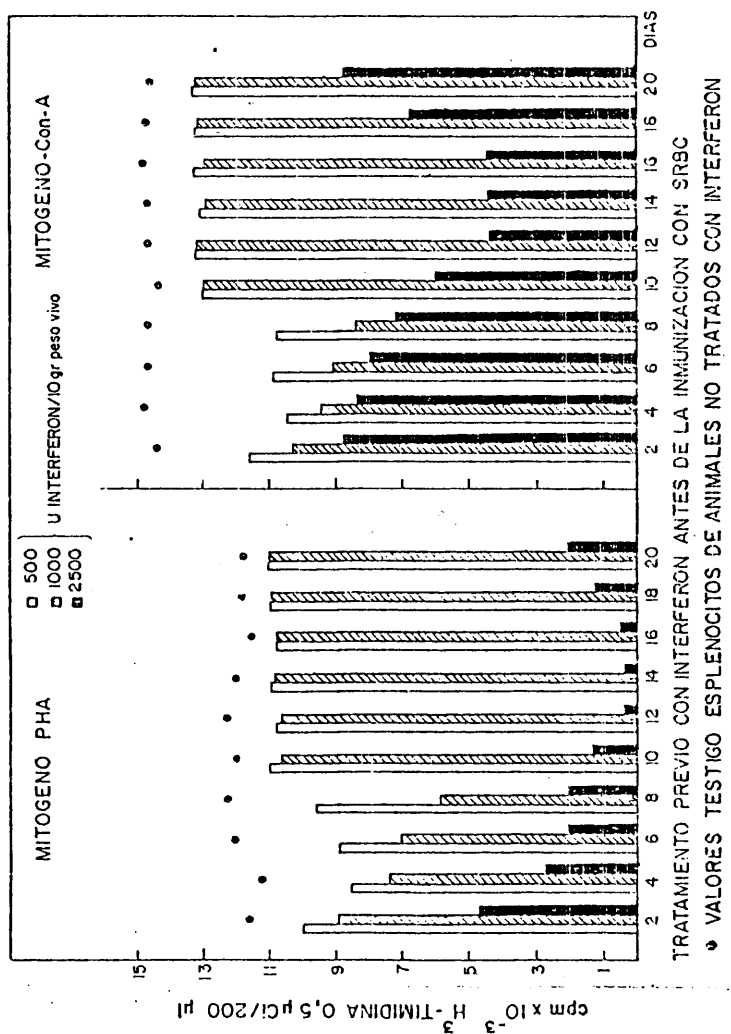


FIGURA 36

EFFECTO SOBRE LA BLASTOGENESIS DE ESPLENOCITOS PROCEDENTES DE RATONES TRATADOS CON INTERFERON EXOGENO INDUCIDO POR LPS DE P. AERU GENOVA

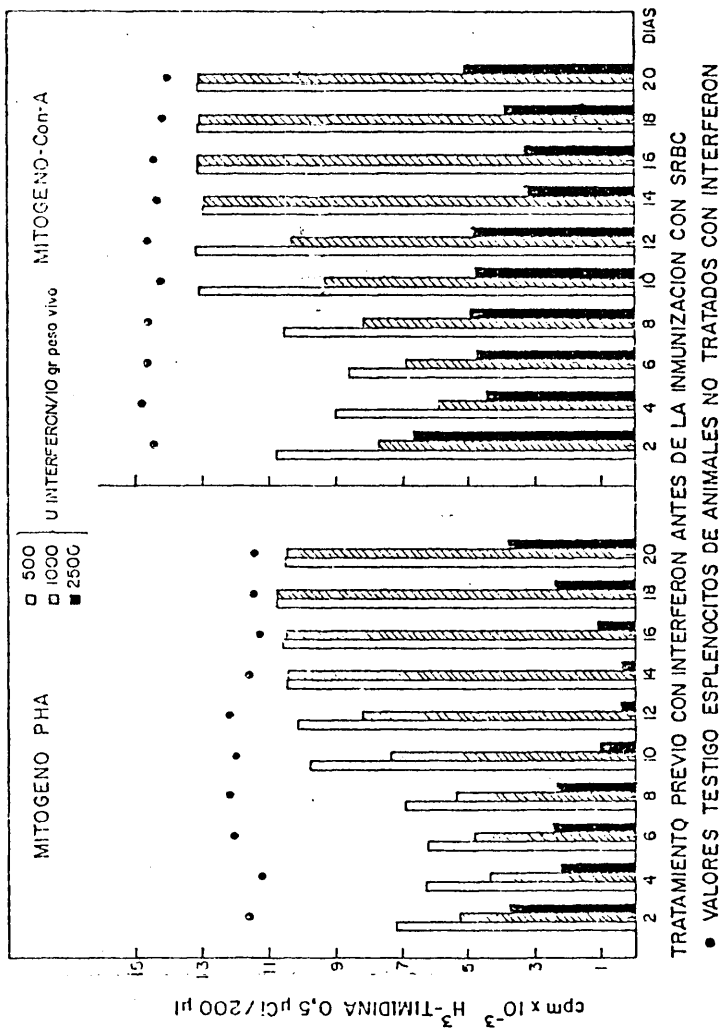


FIGURA 37

En cuanto a la última fase de la inmunorespuesta medida como % de reducción de PFC cuando se administran las mismas dosis de interferón inducido por virus o endotoxinas fue preciso realizar unas experiencias previas que nos orientaron sobre el nivel de respuesta en función de la dosis de inóculo antigénico (Fig. 38) y de la proporción de complemento aviar-cobaya que daba mejores resultados por hacer patente la aparición de placas hemolíticas (Fig. 39), que nos indicaron que una dosis de eritrocitos de 8×10^7 era suficiente para conseguir una inmunización satisfactoria así como que la proporción de complemento aviar y de cobaya debía estar en la relación 1 a 4 respectivamente, en efecto en cuanto a la cantidad de complemento utilizado en la técnica de Jerne, hemos de aclarar que en un principio hicimos pruebas empleando sólo complemento de cobaya como en el caso de los ratones, los resultados negativos nos llevaron a determinar las placas hemolíticas en presencia de complemento aviar o de una proporción de complemento aviar y complemento de cobaya. De ello da muestras la Fig. 39 en la que observamos una falta total de placas hemolíticas cuando se emplea complemento aviar o de cobaya sólo. Las distintas proporciones de ambos complementos nos indican que los mejores resultados, en cuanto a número de placas hemolíticas puestas de manifiesto, se obtienen con la proporción 1 a 4 (aviar:cobaya) rindiendo las demás proporciones valores bastante mas bajos de respuesta PFC.

Una vez conocidos estos datos y por tanto fijadas las condiciones experimentales mas idóneas estudiamos las variaciones en el número de células formadoras de IgM en esplenocitos de pollo (Figs. 40, 41 y 42) y de ratón (Figs. 43, 44 y 45) que habian recibido tratamientos previos (20 a 1 días antes) de interferón inducido por virus o endotoxinas.

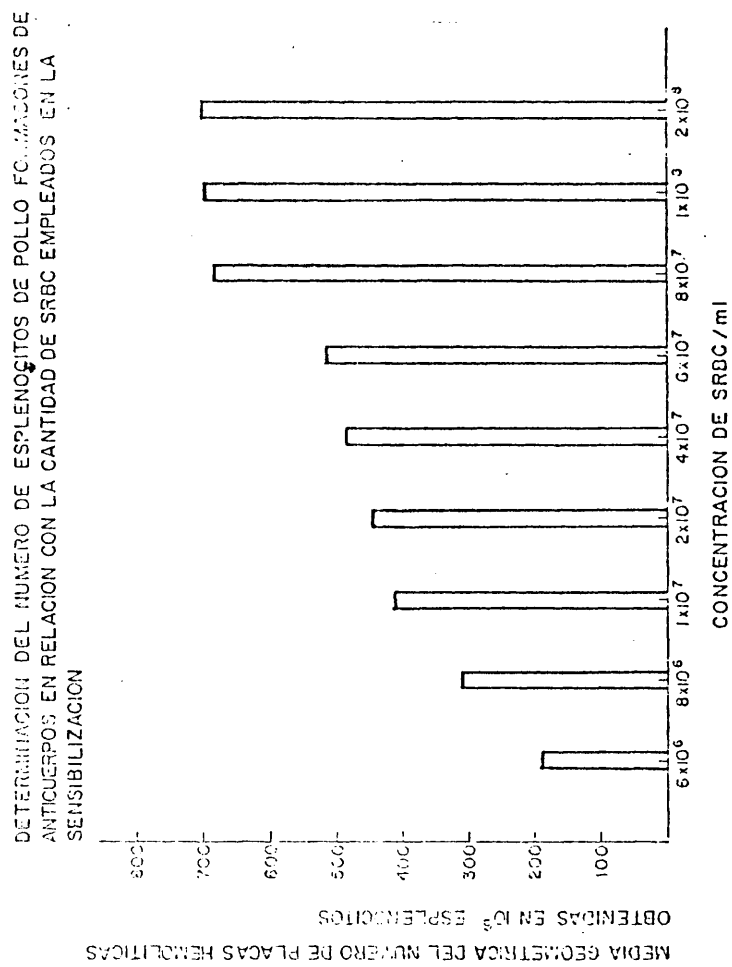


FIGURA 38

DETERMINACION DEL NUMERO DE ESLENOCITOS DE POLLO FORMACIONES DE ANTICUERPOS EN RELACION A LA PROPORCION DE COMPLEMENTO AVIAR Y DE CODAYA EMPLEADO EN LA PRUEBA DE JERNE

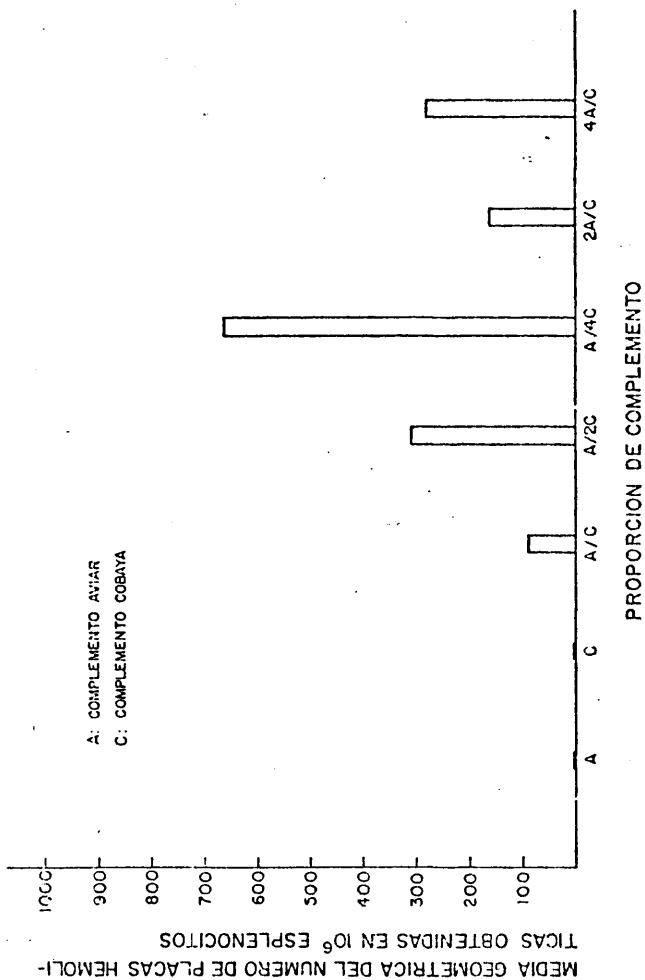


FIGURA 39

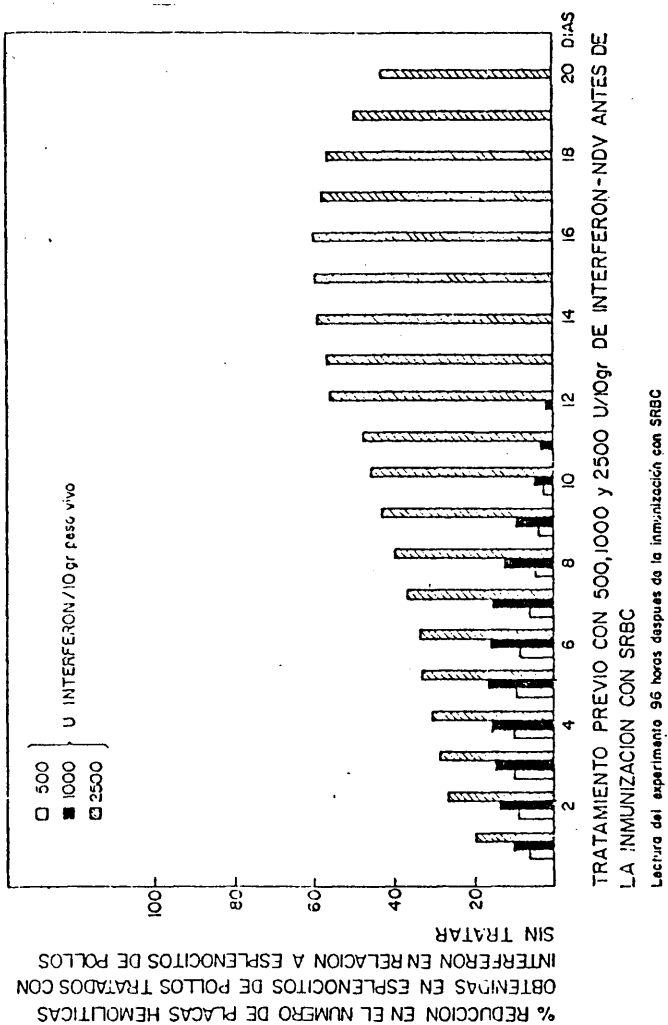


Fig. 40.- Variaciones de PFC por tratamientos con interferón exógeno
 en pollos donadores de esplenocitos.

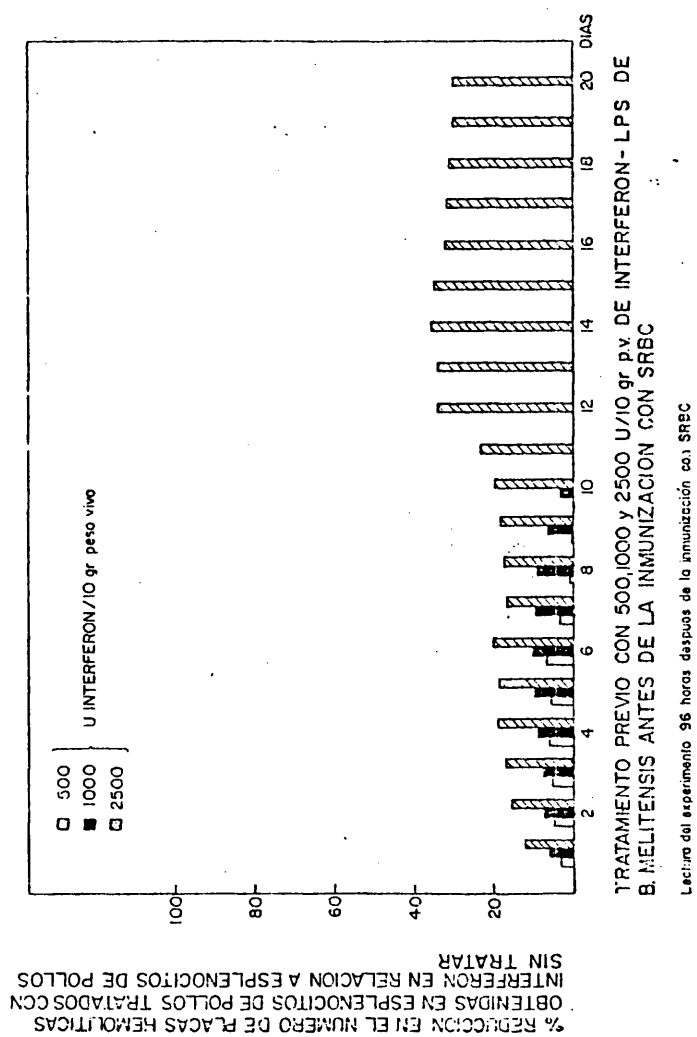


Fig. 41.- Variaciones de PFC por tratamiento con interferón exógeno en
 pollos donadores de esplenocitos.

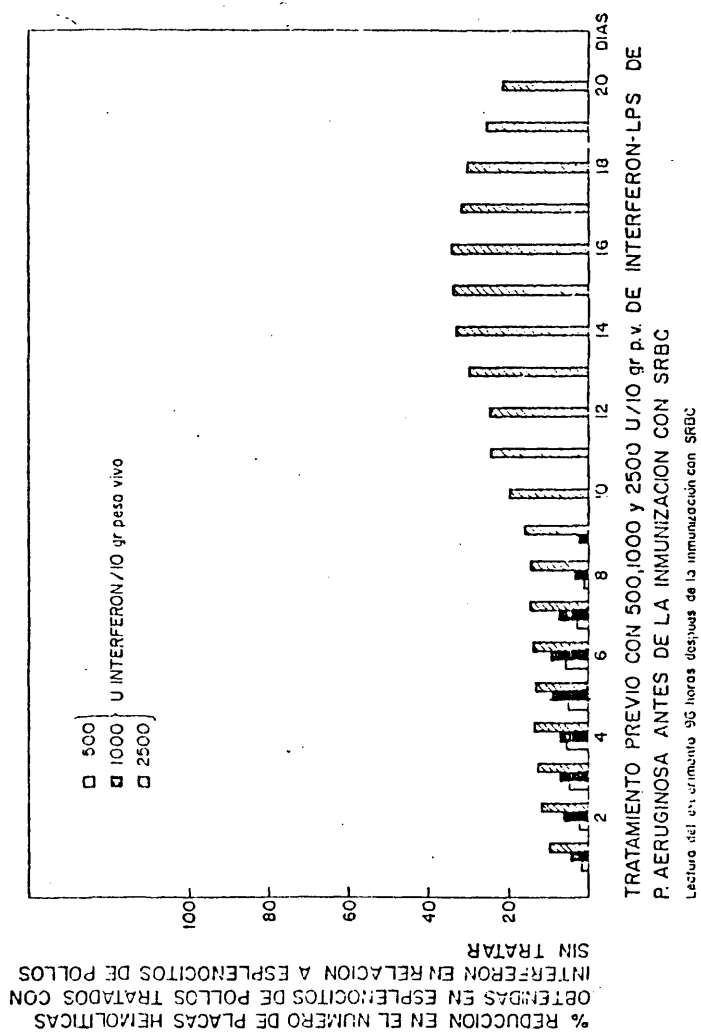


Fig. 42.- Variaciones de pfc por tratamiento con interferón exógeno en pollos donadores de esplenocitos.

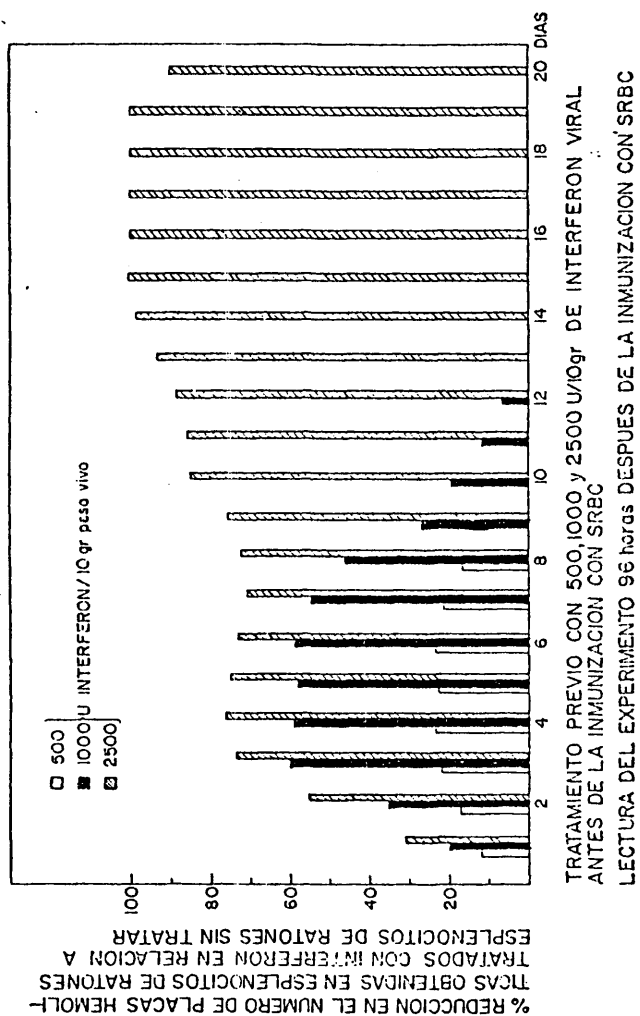


Fig. 43.- Variaciones de PFC por tratamiento con interferón exógeno en ratones donadores de esplenocitos

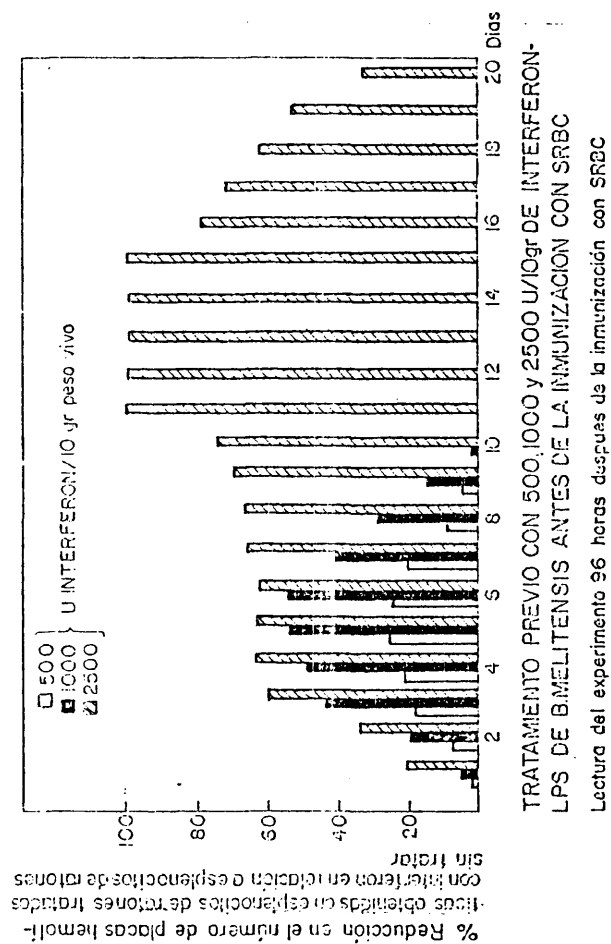


Fig. 44.- Tratamiento con interferón exógeno en ratones donadores de esplenocitos

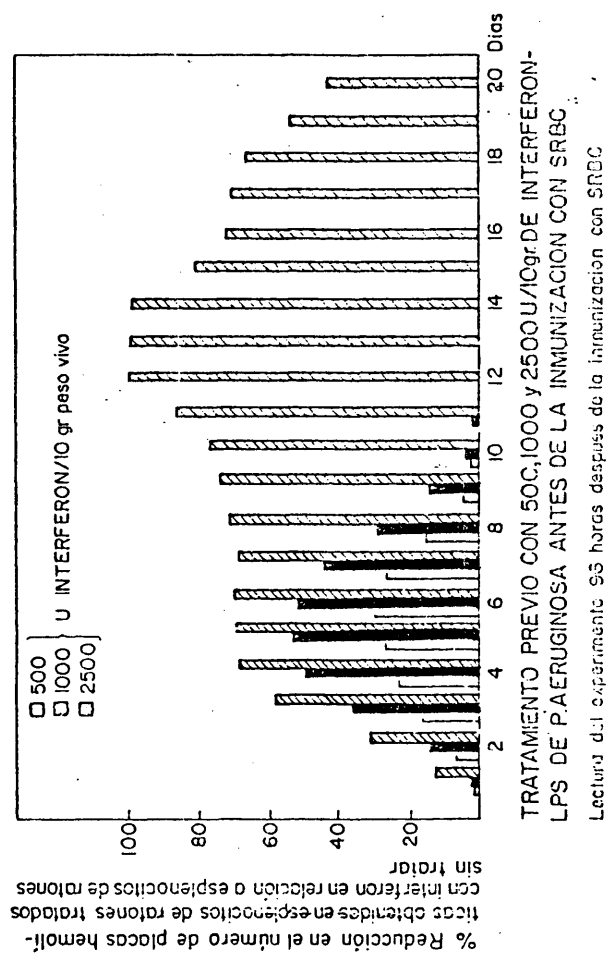


Fig. 45.- Tratamiento con interferón en ratones donadores de esplenocitos

La Fig. 40 recoge los resultados obtenidos con esplenocitos de pollos cuando el interferón es el inducido por NDV. Vemos que tiene lugar una reducción en el número de placas hemolíticas alcanzadas, esta reducción no supera el 60% cuando el interferón se administra entre 14 y 16 días antes de la inmunización siendo la dosis de 2.500 U interferón. Las otras dosis estudiadas produjeron reducciones no mas altas del 15 y 20%, no yendo mas allá de los 10 y 12 días respectivamente.

Los resultados alcanzados por el interferón inducido por LPS de B. melitensis y que quedan resumidos en la Fig. 41 indican también una reducción cuyo máximo no llega al 40% cuando el interferón es administrado 14 días antes de la inmunización en dosis de 2.500 U interferón/10 gr de peso vivo. Las dosis de 500 y 1.000 U interferón no produjeron reducción pasados los 9 y 10 días de administración respectiva, no sobrepasando en ningún momento el 10% de reducción.

Por último, cuando el inductor de interferón administrado es el LPS de P. aeruginosa (Fig. 42) nos encontramos que la dosis 2.500 U interferón produce una reducción máxima en el número de placas hemolíticas que no llega al 40% cuando se administra entre 14 y 16 días antes de la inmunización. Las dosis restantes no producen reducción cuando se administran 8 y 9 días antes de la inmunización para 500 y 1.000 U interferón respectivamente.

En cuanto a los resultados obtenidos en ratones la Fig. 43 muestra los resultados cuando el inductor de interferón es de naturaleza viral. Vemos que 2.500 U interferón son capaces de deprimir la respuesta inmunitaria incluso cuando ese interferón se ha administrado 20 días antes de la inmunización.

Aquellos grupos que han recibido el interferón entre los días 14 y 19 antes de la inmunización primaria con SRBC han alcanzado casi una reducción del 100% en el número de placas hemolíticas lo que supone la casi total supresión de la respuesta inmune.

Las dosis de 500 y 1.000 U interferón originan depresiones que no aparecen después de los 8 y 12 días respectivamente, siendo la reducción máxima de un 60% aproximadamente para la dosis de 1.000 U interferón y de un 20% para la de 500 U interferón entre los periodos comprendidos entre 3-6 y 4-6 días de administración respectivamente.

Con las mismas dosis y periodo de administración antes de la inmunización pero administrando el interferón inducido por LPS de B. melitensis obtenemos resultados que recogemos en la Fig. 44.

En ella observamos que en estas condiciones experimentales encontramos una reducción en el número de placas hemolíticas cuyos porcentajes son menores que los observados cuando el inductor de interferón ha sido de naturaleza viral.

Con respecto a las dosis administradas, la de 2.500 U interferón ocasiona depresiones en la inmunorespuesta, incluso cuando se administra al animal 20 días antes de la inoculación con SRBC, estando muy próxima la reducción al 100%, cuando se administra entre 11 y 15 días antes de la inmunización.

Como en el caso precedente, las dosis de 500 y 1.000 U interferón producen reducción en el número de placas hemolíticas, que no pasa de los días 9 y 10 respectivamente.

Finalmente, los resultados representados en la Fig. 45 nos indican que cuando el interferón ha sido el inducido por LPS de P. aeruginosa y a la dosis de 2.500 U interferón también tiene lugar una reducción casi total de la respuesta inmune (casi un 100% de reducción en el número de placas hemolíticas) cuando el interferón se ha administrado entre 12 y 14 días antes de la inmunización.

Las dosis de 500 y 1.000 U interferón ocasionaron depresiones que no fueron más allá de los días 10 y 11 antes de la inmunización respectivamente.

5. Acción del interferón "in vitro" sobre la respuesta inmune en pollo y ratón.

Con el propósito de conocer la influencia del interferón sobre inmuno-respuestas primarias anti-SRBC, se han realizado experimentos sobre esplenocitos procedentes de animales primariamente inmunizados con SRBC. Estos esplenocitos fueron tratados "in vitro", en intervalos variables de 1 a 10 horas con dosis diferentes de interferón inducido por virus y endotoxinas (500, 1.000 y 2.500 U interferón/ml) y manteniendo el sistema esplenocitos-interferón a 4° C durante todo el tiempo de contacto. Simultáneamente, en ensayos paralelos y como testigo, se hicieron tratamientos de los esplenocitos con lotes de "falso" interferón.

Sobre las dos series de esplenocitos, tratados con interferón y "falso" interferón, se determinaron las variaciones producidas por este tratamiento sobre la aparición de células formadoras de IgM en los animales inmunizados frente a SRBC y

sobre la actividad policlonal inducida por lectinas, en función de la incorporación de ^3H -timidina.

5.1. Acción sobre las células formadoras de IgM

En las determinaciones efectuadas con esplenocitos de pollo tratados con dosis de 500 y 1.000 U interferón, se encontraron valores de recuentos de placas hemolíticas sensiblemente iguales a los testigos; sin embargo, la dosis de 2.500 U interferón ha producido disminución en el número de células formadoras de anticuerpos; así en la Fig. 46 tan solo se muestran los resultados obtenidos cuando se administra esta dosis 2.500 U interferón/ml por ser la más demostrativa de la acción inmunodepresora.

Se observa que en cada una de las determinaciones aparece una disminución del número de placas hemolíticas respecto al testigo inmunizado tratado con "falso" interferón, que es muy parecida dentro de las siete primeras horas de contacto y resulta mas evidente entre las 8 y 10 horas. La disminución mayor corresponde al interferón inducido por el NDV, mientras que el interferón inducido por el LPS procedente de P. aeruginosa produce un efecto menos patente con respecto al mismo control.

Siguiendo nuestro propósito comparativo efectuamos la misma prueba con esplenocitos de ratones, pudiendo observar que dosis de 500 a 1.000 U interferón daban valores iguales que los encontrados con esplenocitos testigos tratados con "falso" interferón, mientras que con la dosis de 2.500 U interferón se obtienen los resultados que aparecen en la Fig. 47;

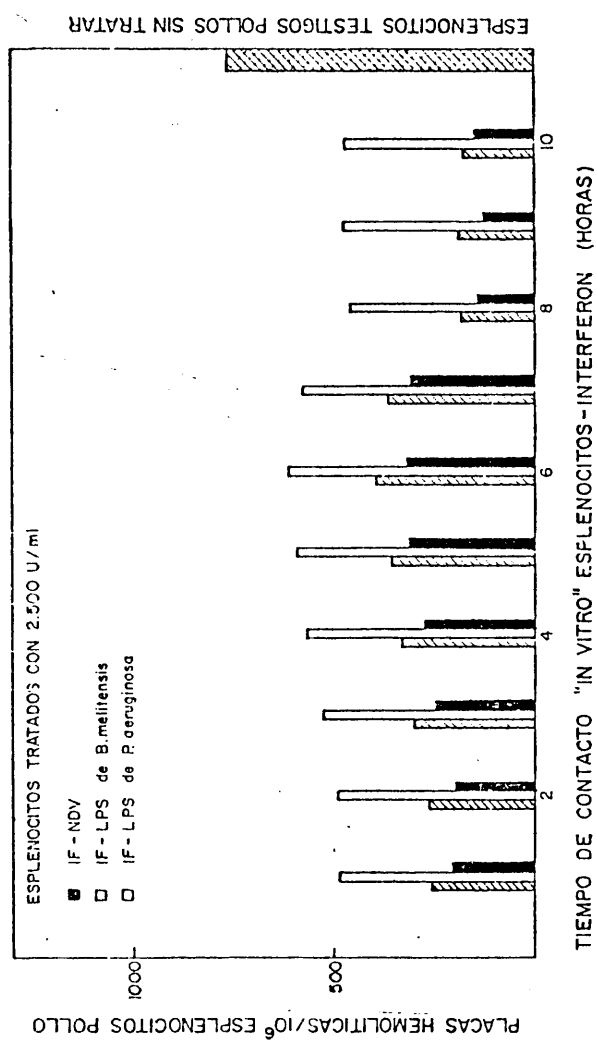


Fig. 46.- Variaciones de respuesta en células formadoras de IgM correspondiente a esplenocitos de pollo después del tratamiento "in vitro" con interferones inducidos por diferentes agentes.

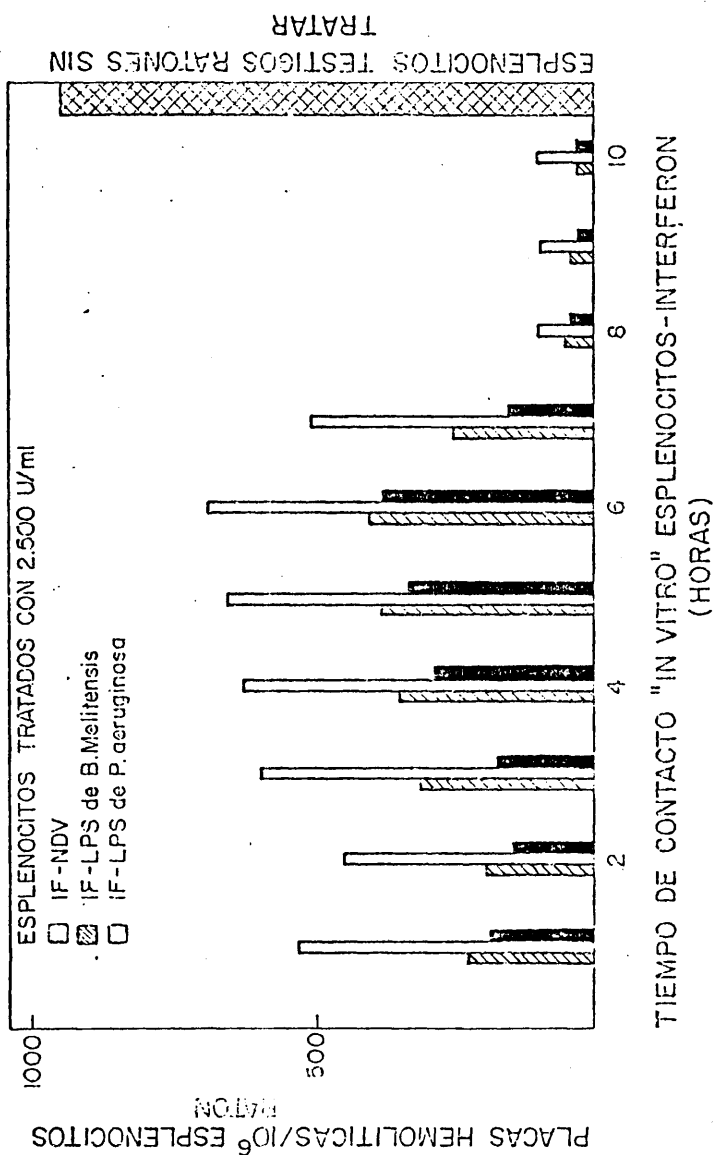


Fig. 47.- Variaciones de respuesta de las células formadoras de IgM correspondiente a esplenocitos de ratón después del tratamiento "in vitro" con interferones inducidos por diferentes agentes.

en ella observamos que para cada una de las determinaciones hay una disminución en el número de placas hemolíticas con respecto a los testigos. Vemos que ese número de placas aumenta en relación con el número de horas de contacto durante las 6 primeras determinaciones y con una excepción para intervalos de 2 horas, donde encontramos una reducción más patente. El periodo comprendido entre 8 y 10 horas de contacto indica una fuerte reducción en la inmuno-respuesta estudiada.

5.2. Acción sobre la activación policlonal de los esplenocitos

Al estudiar las variaciones inducidas por interferón en la activación por lectinas, según se indica en el capítulo de técnicas vemos que en los resultados obtenidos con dosis de 500 y 1.000 U interferón no hay diferencia entre los esplenocitos tratados con interferón viral y con "falso" interferón, empleado como testigo.

Las Figs. 48 y 49 indican los resultados obtenidos con 1.500 U sobre esplenocitos de pollo y de ratón, respectivamente, ya que fueron las dosis mas efectivas. En la Fig. 48 se muestran los resultados obtenidos, utilizando dos mitógenos (PHA y Con A) y se puede observar que el segundo conduce a una mayor blastogénesis de los cultivos de esplenocitos "in vitro" con los diferentes interferones; salvando esta diferencia, ambos mitógenos proporcionan valores paralelos. Observamos también con respecto al inductor de interferón estudiado, que el interferón inducido por LPS procedente de *P. aeruginosa* proporciona valores mas altos en c.p.m. que los restantes interferones, siendo el más débil en su acción el interferón inducido por el NDV.

En cuanto a las horas de contacto "in vitro" vemos que

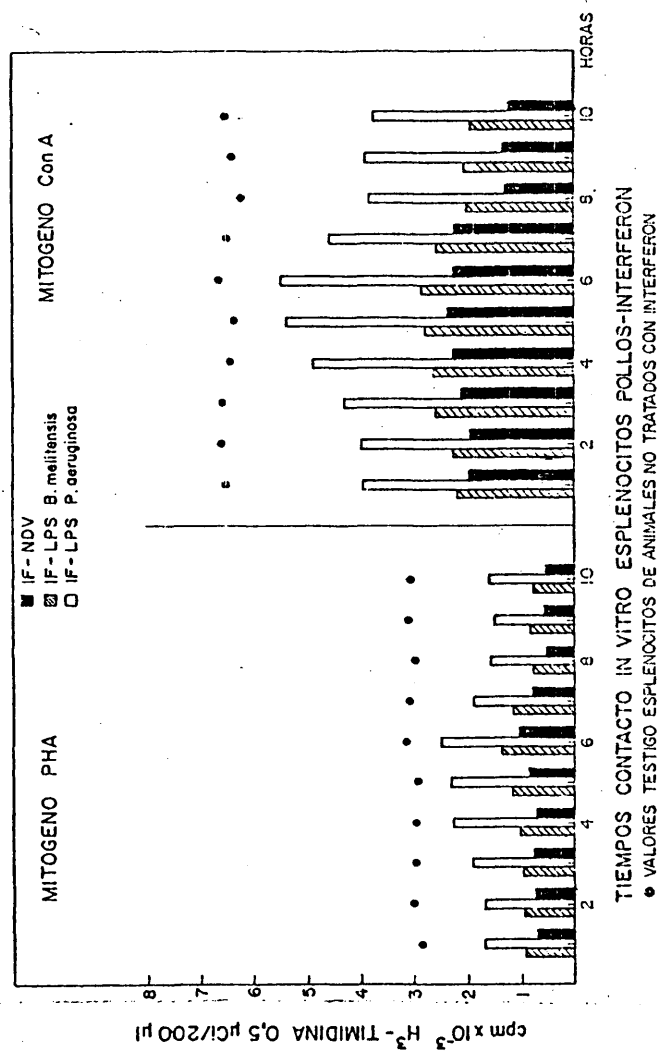


Fig. 48.- Variaciones en la incorporación de ³H tímídina en esplenocitos de pollo tratados con interferón exógeno.

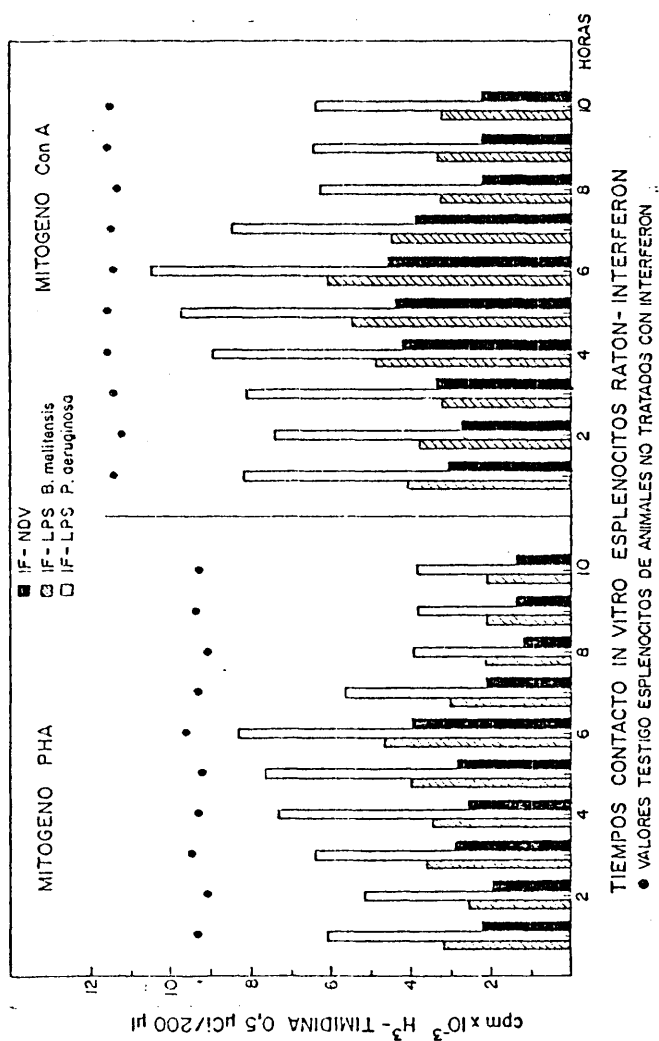


Fig. 49.- Variaciones en la incorporación de ³H timidina en esplenocitos de ratón tratados con interferón exógeno.

se alcanza mayor número de cpm con aquellos cultivos de esplenocitos que han recibido tratamiento en periodos de 4 a 6 horas, siendo la menor respuesta la que corresponde a los esplenocitos tratados durante 8 a 10 horas.

Con respecto al inductor de interferón utilizado también vemos que el NDV induce un interferón que condiciona una mayor disminución en el número de placas hemolíticas, comparando con los interferones obtenidos con los otros inductores; de ellos, el procedente de P. aeruginosa es el más débil en su acción depresora para estas condiciones experimentales.

Finalmente, en la Fig. 49, se presentan los resultados producidos por la acción de los distintos interferones estudiados por nosotros en este trabajo sobre la blastogénesis de los esplenocitos murinos sometidos a tratamiento "in vitro" con tales interferones.

Al igual que lo expuesto en aves, el mitógeno Con A ha proporcionado valores mayores de blastogénesis, medida en cpm, que el alcanzado por mitógeno PHA. Comprobamos también en cuanto a las horas de tratamiento, que el número de cpm va aumentando progresivamente dentro de las 6 primeras horas de contacto, con una excepción en las 2 horas de tratamiento donde aparece un ligero descenso que coincide con el valor correspondiente a las 7 horas de contacto. El periodo de contacto comprendido entre las 8 y 10 horas es el que presenta menor número de cuentas con respecto a las restantes determinaciones, siendo la diferencia bastante marcada.

En cuanto al inductor de interferón observamos que, igual que en pollos, el interferón inducido por NDV produce los valores menores de blastogénesis y son los mas altos aquellos que corresponden al interferón inducido por LPS procedente de P. aeruginosa.

6. Inducción de interferón con tilorona, en pollo y ratón y su influencia en la inmunorespuesta.

Una vez estudiada la inducción de interferón por los métodos que pudiéramos considerar mas clásicos, mediante la acción de virus o endotoxinas, así como su repercusión sobre el sistema inmunitario del huésped, consideramos de interés estudiar la inducción de interferón por una molécula orgánica de síntesis (tilorona) que presenta la característica de ser el único inductor de interferón por vía oral y el cual ha sido ensayado solamente en mamíferos. Al igual que hicimos con los otros inductores, hemos estudiado también su influencia sobre la respuesta inmune, siguiendo para ello un desarrollo experimental análogo al hasta aquí expuesto; es decir, sobre pollos y ratones "in vivo"

6.1. Respuesta en niveles de interferón circulante y sobre células formadoras de IgM.

Ante la complejidad del experimento que emprendimos fue imprescindible fijar previamente, como parámetro, el título máximo de interferón detectable en el suero de los animales que habian recibido tilorona. Para ello se ha utilizado este inductor tanto en dosis únicas como diariamente durante un periodo de cinco días, pasados los cuales se hizo sangría a muerte. Este periodo de 1-5 días viene condicionado por los experi-

mentos posteriores dado que entre el 4° y 5° día se desarrolla el máximo de inmuno-respuesta primaria anti-SRBC. Como dosis se han administrado 0,3 mg/10 gr peso vivo mediante sonda esofágica, tanto en la dosis única como en las repetidas.

Los títulos interferón referidos a unidades/ml quedan reflejados en la Fig. 50 para pollo y en la Fig. 51 para ratón. En ambas figuras se pueden observar mas altos títulos de interferón en ratones, comparados con los obtenidos en aves tratadas con tilorona; por lo demás, el comportamiento es completamente paralelo entre mamíferos y aves. La máxima respuesta se obtiene con una sola dosis administrada 1 día antes de la obtención del suero, encontrándose una disminución gradual de los valores interferón que parece relacionarse con el intervalo entre administración y titulación. Cuando se consideran las dosis múltiples, se encuentra una relación directa entre el título de interferón y el número de dosis, existiendo una compensación entre la disminución debida al intervalo y el incremento consecuente al aumento de tilorona administrada.

Una vez conocidos los títulos de interferón que aparecen en suero entre 1 y 5 días, pasamos a determinar el nivel de inducción de interferón y la cuantificación de células formadoras de IgM. Se han llevado a cabo estas pruebas con dos series paralelas, tanto de pollos como de ratones, que se inmunizaron con SRBC y administrando la tilorona en agua de bebida (según se indicó en el apartado de Técnicas) entre 1 y 10 dosis en periodos variables previos a dicha inmunización. Pasados cuatro días de la inmunización todos los animales de una de las series fueron donadores de los bazos para las pruebas de Jerne y de blastogénesis, siendo sacrificados por dislocación cervical,

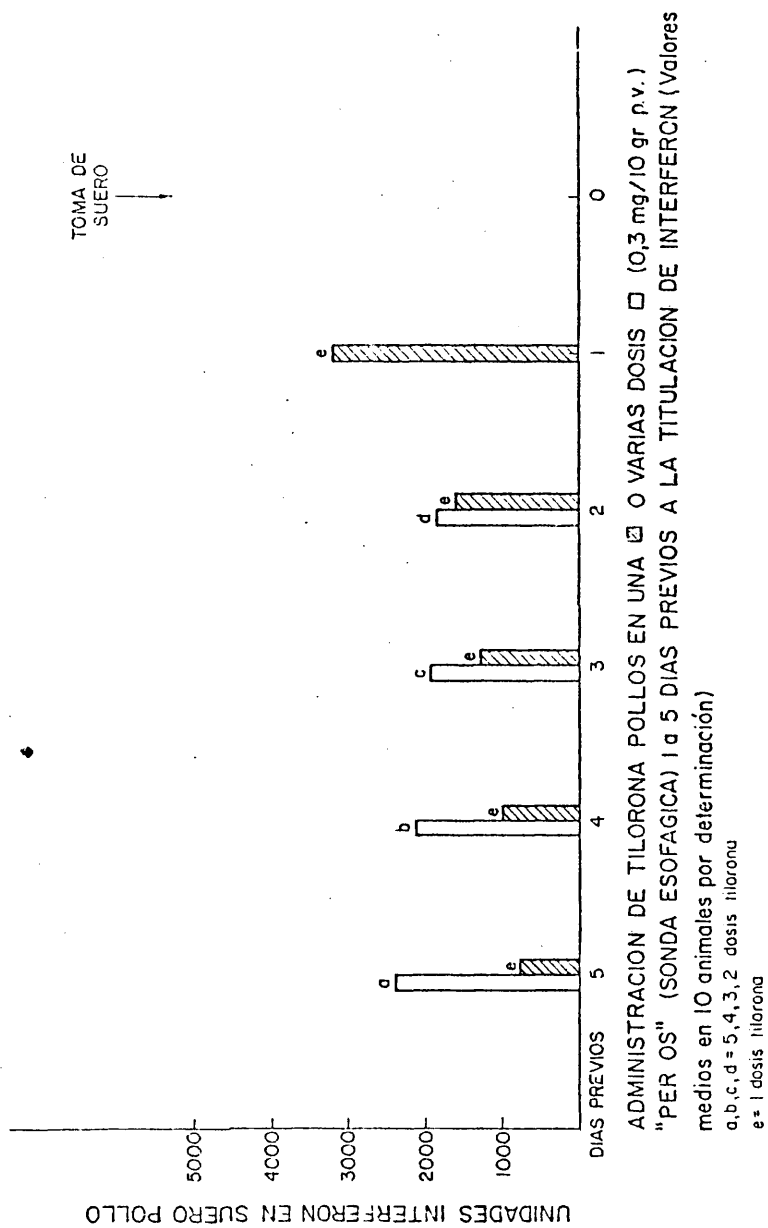


Fig. 50.- Niveles de interferón circulante inducido en pollos por tratamientos con tilorona.

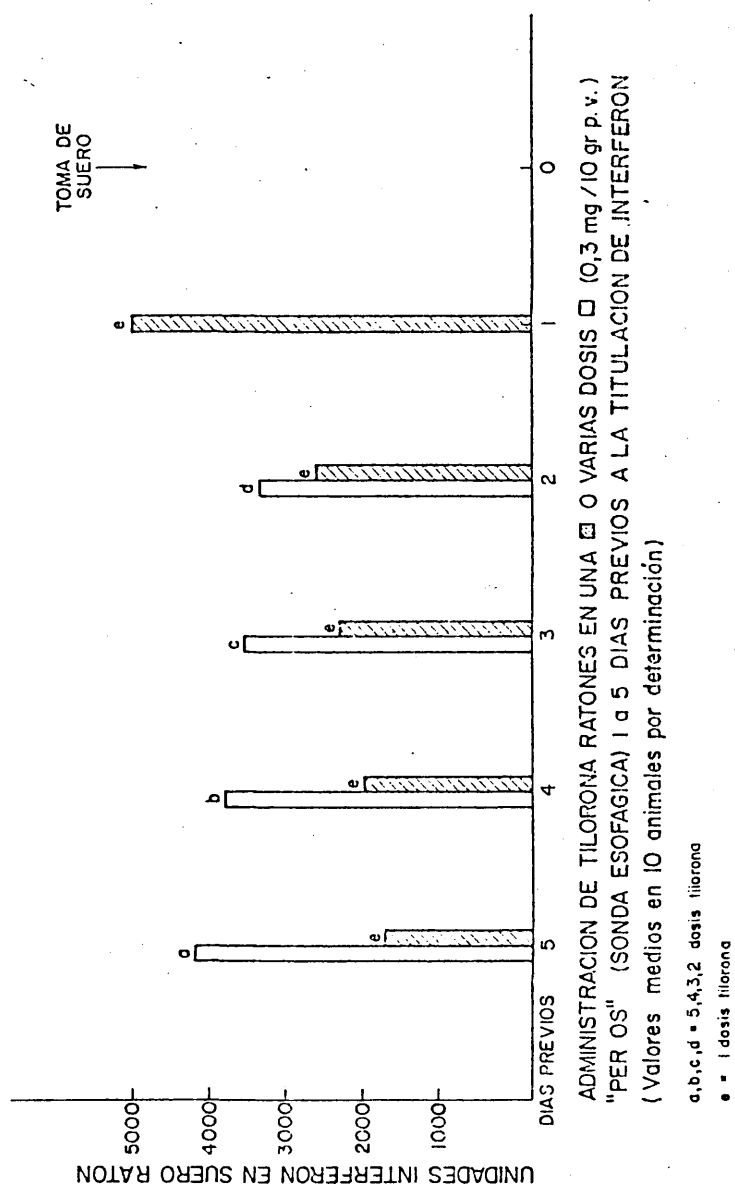


Fig. 51.- Niveles de interferón circulante inducido en ratones por tratamientos con tilorona.

mientras que todos los animales de la otra serie fueron sangrados a muerte por punción intracardiaca para llevar a cabo sobre el suero sanguíneo, la titulación de interferón.

Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Fig. 52 (correspondiente a pollos) y Fig. 53 (correspondiente a ratones).

La respuesta de interferón en pollos por la acción de la tilorona aumenta paulatinamente a medida que aumenta el número de dosis recibidas correspondiendo un máximo de respuesta interferón a los 4 días de tratamiento (4 dosis) donde aparece un incremento de un 71,43% con respecto al primer día de administración permaneciendo constante a partir de ese momento los niveles de interferón en suero.

En la Fig. 53 (con ratones), observamos también un incremento de los títulos de interferón paralelo al observado en pollos. También en este caso se alcanzan los valores máximos a partir del 4° día en el que encontramos un 39,41% de aumento con respecto al nivel encontrado el primer día, este valor se mantiene constante hasta el último día de observación.

Como hemos señalado al principio del presente capítulo considerábamos de interés estudiar la inducción de interferón a través de una sustancia, tilorona, cuya característica era la de ser el único inductor de interferón por vía oral y, para aportar nuevos datos consideramos necesario estudiar su efecto sobre la respuesta inmune. Hemos encontrado que la tilorona administrada en los días por nosotros establecidos, según consta en las figuras precedentes, presenta un fuerte efecto

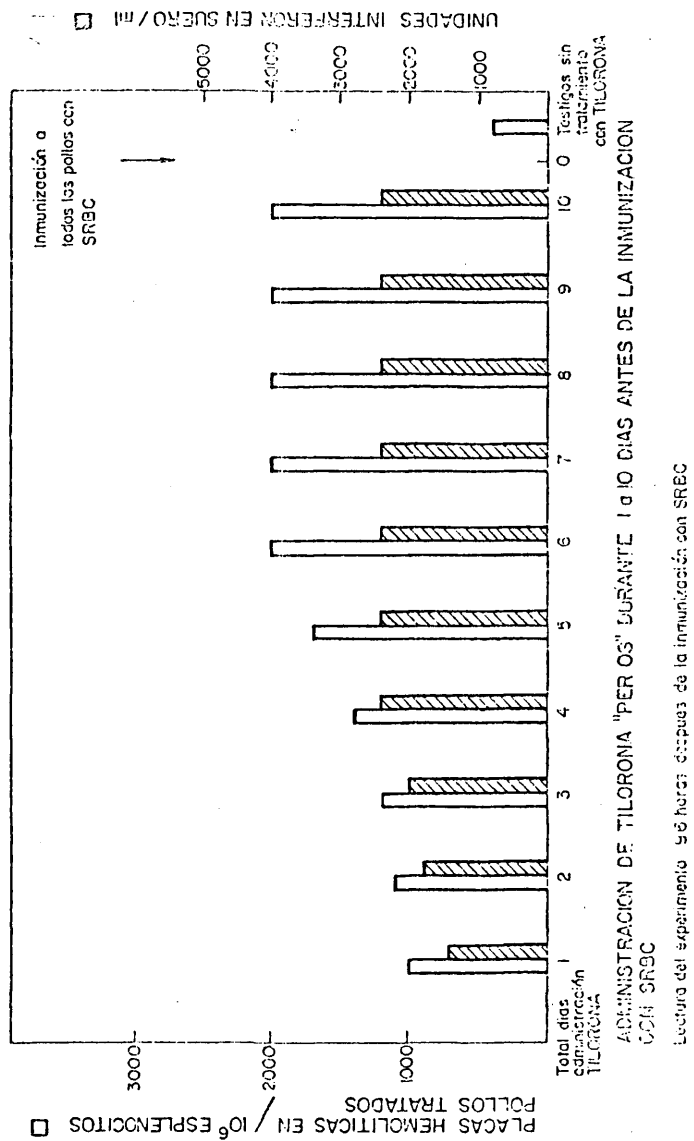


Fig. 52.- Niveles de interferón circulante y número de células formadoras de IGM procedentes de pollos sometidos a tratamientos variables con tilorona.

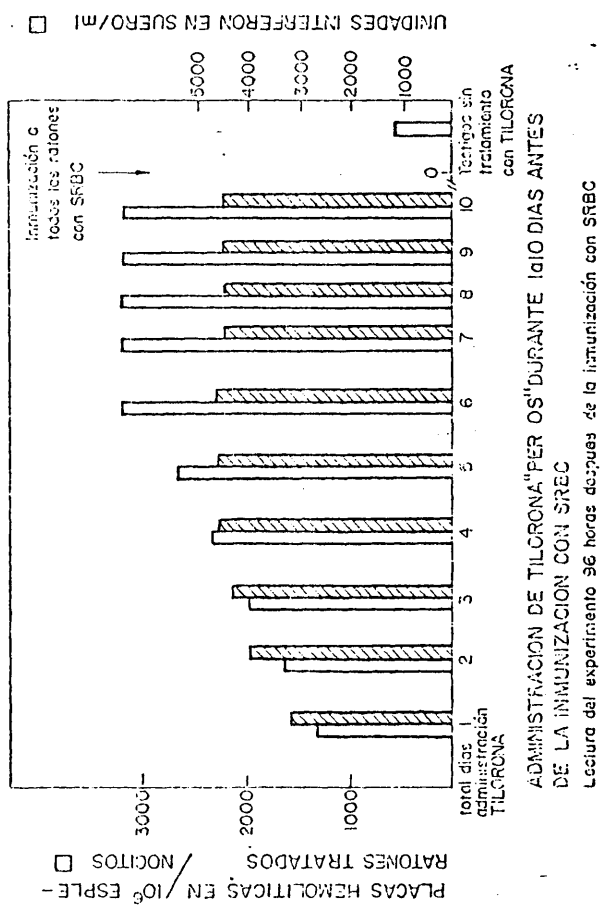


Fig. 53.- Niveles de interferón circulante y número de células formadoras de IGM procedentes de ratones sometidos a tratamientos variables con tilorona.

inmunoestimulante en todas y cada una de las determinaciones efectuadas. El aumento encontrado en el número de placas hemolíticas es progresivo entre 1 y 6 dosis de administración, momento en el que se alcanza el máximo de respuesta en células formadoras de placas hemolíticas (con 6 días de tratamiento) permaneciendo constante a partir de este momento hasta el último día estudiado; así hemos observado un incremento en el número de células formadoras de IgM representado por un 150% hasta un 500% para las dosis 1 a 6 de administración de la droga respectivamente en el caso de pollos tratados.

Cuando se estudia el efecto sobre ratones, también observamos un gran aumento en la respuesta inmune alcanzada medida en placas hemolíticas, este aumento es de un 145% cuando la tilorona se administra un día antes de la inmunización y de un 550,33% a partir del sexto día hasta el final, pasando por valores intermedios en los días comprendidos entre ese intervalo de tiempo.

En todas las determinaciones estos valores están calculados con relación a los testigos inmunizados y sin tratamiento con tilorona.

Si se comparan ambas respuestas (interferón e inmune), observamos que a partir del cuarto día sus valores cuantitativos empiezan a separarse tanto en pollo como en ratón. Por otra parte, se puede ver que el grado de estimulación del interferón es mayor en ratones (4.600 U interferón/ml) que en pollos (2.400 U interferón/ml).

6.2. Variaciones de respuesta en la activación policlonal de linfocitos

Esplenocitos extraídos de pollos y ratones, que habían estado sometidos al tratamiento con tilorona, fueron cultivados in vitro según se detalla en el apartado de Métodos y se sometieron a estimulación mediante dos tipos de lectinas que actúan a nivel de células T (Con A y PHA). Examinando conjuntamente los resultados en las Figs. 54 (correspondiente a pollos) y 55 (correspondiente a ratones) se aprecia una vez más una mayor intensidad de respuesta por parte de los mamíferos que de las aves, siendo la diferencia de la acción blastogénica entre la Con A y la PHA mucho más patente en pollos. Tanto en pollos como en ratones encontramos que los valores indicadores de blastogénesis van aumentando a medida que es mayor el número de dosis de tilorona alcanzando en todos los casos el valor máximo en los 6 días de administración y encontrándose incrementada la incorporación de ^3H -timidina incluso en células que no habían sido sometidas a la acción de los mitógenos.

En la Fig. 54 y con el mitógeno Con A vemos que los valores presentan un incremento relativo de un 105,88% en el caso de tratamiento con tilorona en ausencia de lectina y desde un 5,88% hasta un 176,47% cuando está presente la lectina en el intervalo comprendido entre 1 y 6 días de tratamiento con respecto a los testigos correspondientes.

Los incrementos relativos con el mitógeno PHA van desde un 28,57% hasta un 228,57% sin mitógeno y desde un 128,57% hasta 442,86% cuando está presente el mitógeno correspondiente.

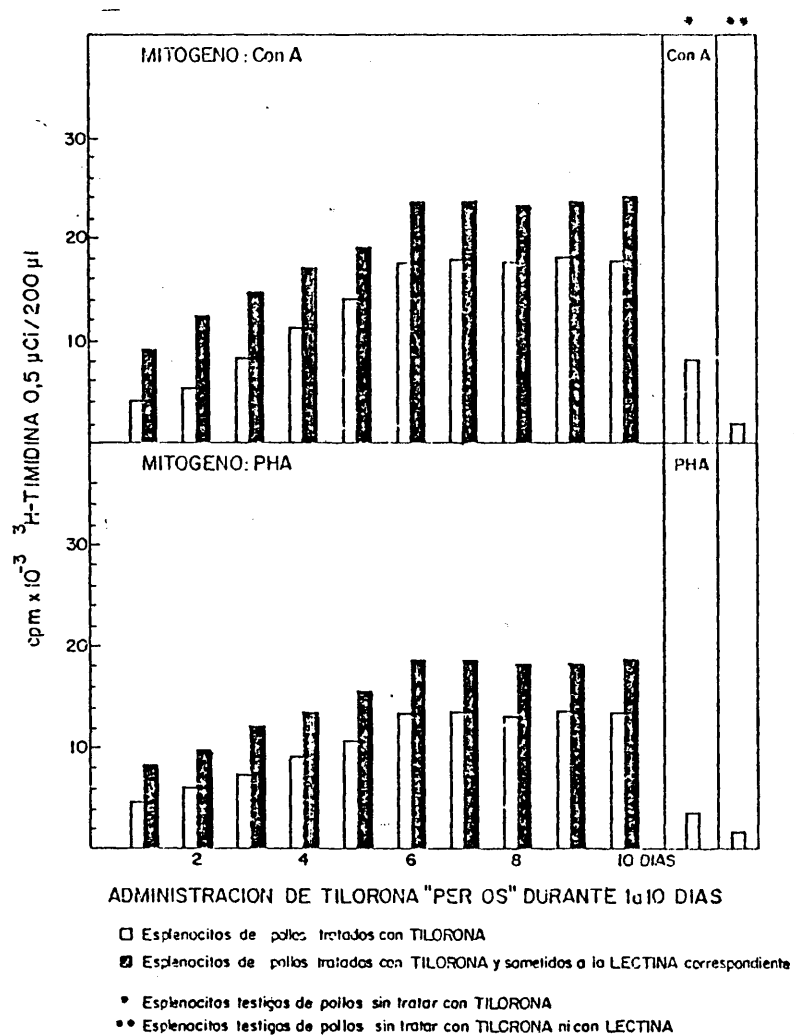


Fig. 54.- Variaciones en la incorporación de ^3H timidina en pollos sometidos a tratamientos variables con tilorona

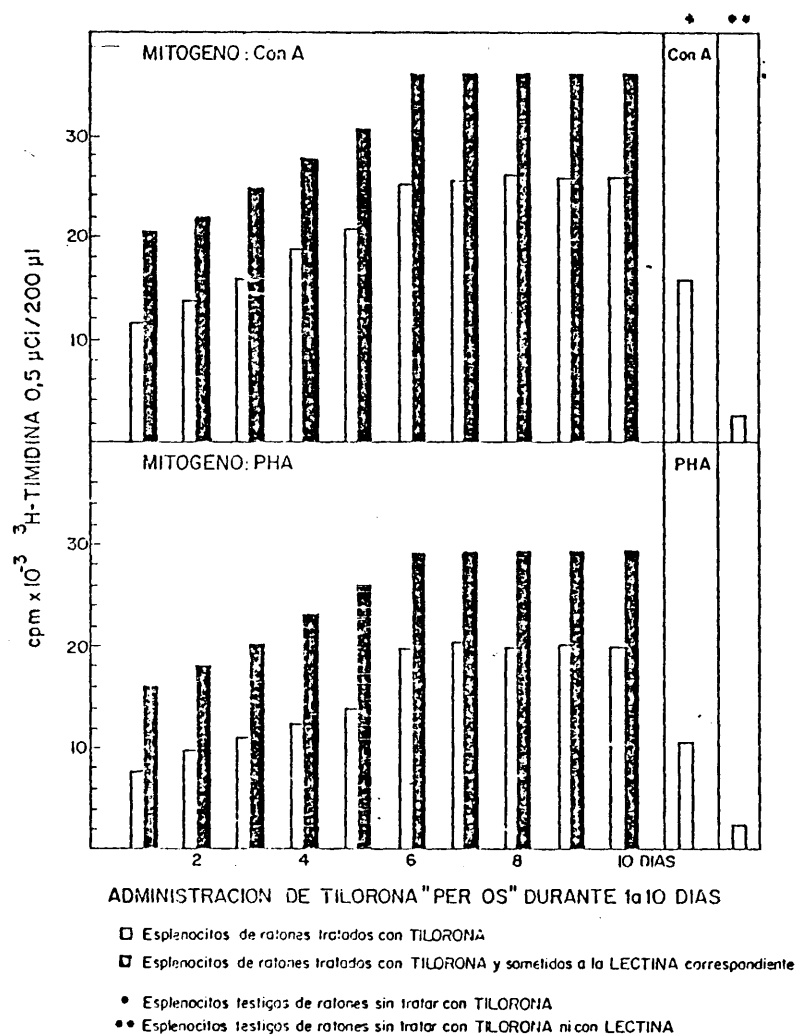


Fig. 55.- Variaciones en la incorporación de ³H timidina en linfocitos procedentes de ratones sometidos a tratamientos variables co tilorona.

En la Fig. 35, con los resultados observados en ratones, vemos unos incrementos relativos del 50% en ausencia de mitógenos y de un 125% en presencia de mitógeno Con A. En la parte inferior de la figura los valores absolutos van desde 74,07% hasta 185,19% en ausencia de mitógeno y desde 148,15% hasta 277,78% cuando los cultivos de esplenocitos están tratados con PHA.

7. Estudio comparativo del efecto de la ciclofosfamida sobre la inducción de interferón e inmunorespuesta en pollos.

Interesados por conocer el papel de la ciclofosfamida en la inmunorespuesta del huésped infectado con virus, realizamos una serie de experimentos en los cuales se estudiaba las variaciones en la aparición de células formadoras de anticuerpos IgM en función, tanto de la naturaleza del agente infectivo como del tipo de sistema inmunitario del huésped. Conocidos estos datos se ha estudiado la influencia de este agente alquilante en la inducción de interferón y en la inmunorespuesta en pollos.

Este tipo de ensayos requería unas pruebas previas que nos permitieran conocer algunos parámetros biológicos relativos al comportamiento del virus en las fases tempranas de la inmunorespuesta.

7.1. Ensayos previos con los agentes virales y ciclofosfamida

En primer lugar se estudiaron los tiempos previos de inoculación de VSV (Fig. 56) y de NDV (Fig. 57), en pollo y ratón, antes de la obtención de esplenocitos, teniendo en cuenta que el agente viral hubo de ser termoinactivado para los

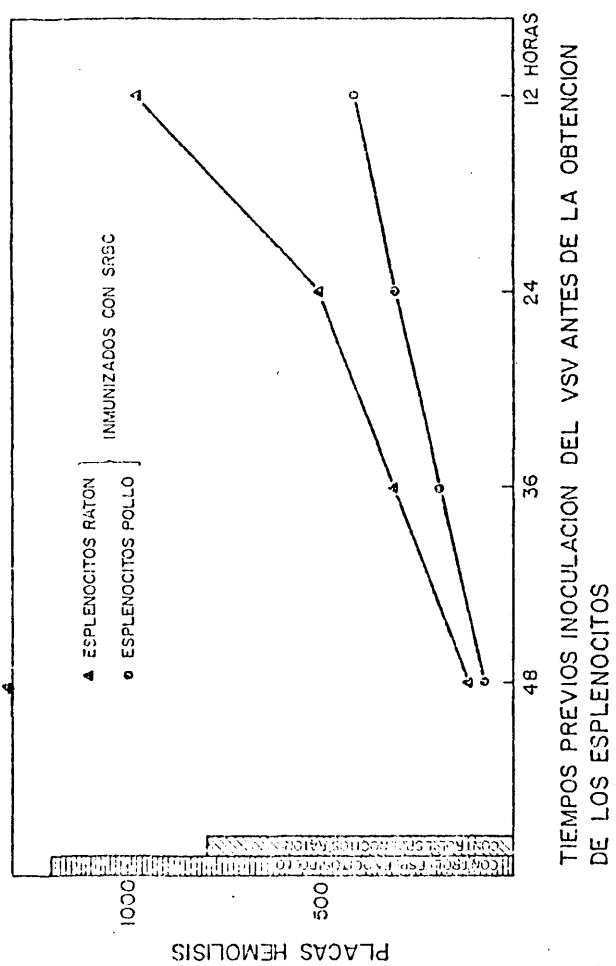


Fig. 56.- Efecto de la infección con VSV (100 UFP) en la inmunorespuestas primaria anti-SRBC medido en PFC.

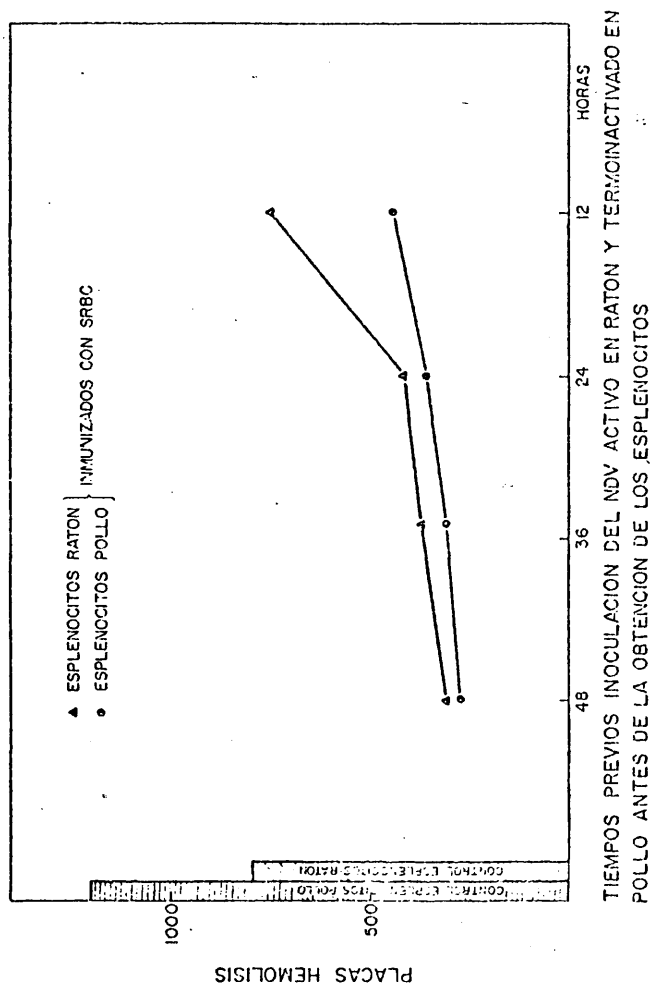


Fig. 57.- Efecto de la infección con NDV (1×10^3 DICT) en la inmunorespuesta primaria anti-SRBC medido en PFC

experimentos sobre pollo. Se utilizaron periodos cortos de observación y en ambos casos hay una clara diferencia de comportamiento en función de la respuesta en PFC entre ratón y pollo, cuando la infección viral se produce entre 24 y 12 horas antes de la obtención de esplenocitos, apareciendo una clara inmunosupresión en todos los casos 48 horas antes (en especial para el VSV).

En una segunda fase de estos ensayos previos se estudió la acción de la ciclofosfamida en los mismos sistemas animales inoculados con VSV (Fig. 58) y NDV (Fig. 59); de este modo se comprobó, para un periodo de 1 a 5 días de intervalo previos, que en presencia de ciclofosfamida aparece una inmunosupresión menos intensa que con el virus solo y que ambas respuestas inmunosupresoras siguen comportamientos paralelos disminuyendo a medida que se acortan los intervalos que median entre la infección por virus y la obtención de los esplenocitos; en cuyo caso se alcanzan valores de inmunosupresión del 100 y 91,7% con el VSV y NDV solos y del 80,5 y 73% respectivamente en tratamientos combinados con ciclofosfamida.

Seguidamente se establecieron otras condiciones experimentales, que nos permitieron apreciar mejor el fenómeno; en estos casos la inmunización con SRBC se realizaba en periodos fijos de 4 días antes de la obtención de los esplenocitos y el tratamiento (tanto con el virus solo como simultaneado con el agente alquilante) y se iniciaba a partir de 7 días antes de la obtención de las células. En estas condiciones se pudo observar una clara diferencia del comportamiento del VSV (Fig. 60) y NDV termoinactivado (Fig. 61). Con el NDV la asociación virus-ciclofosfamida 1 día después de la inmunización no produce efectos inmunosupresores comportamiento que contrasta con la gran supe-

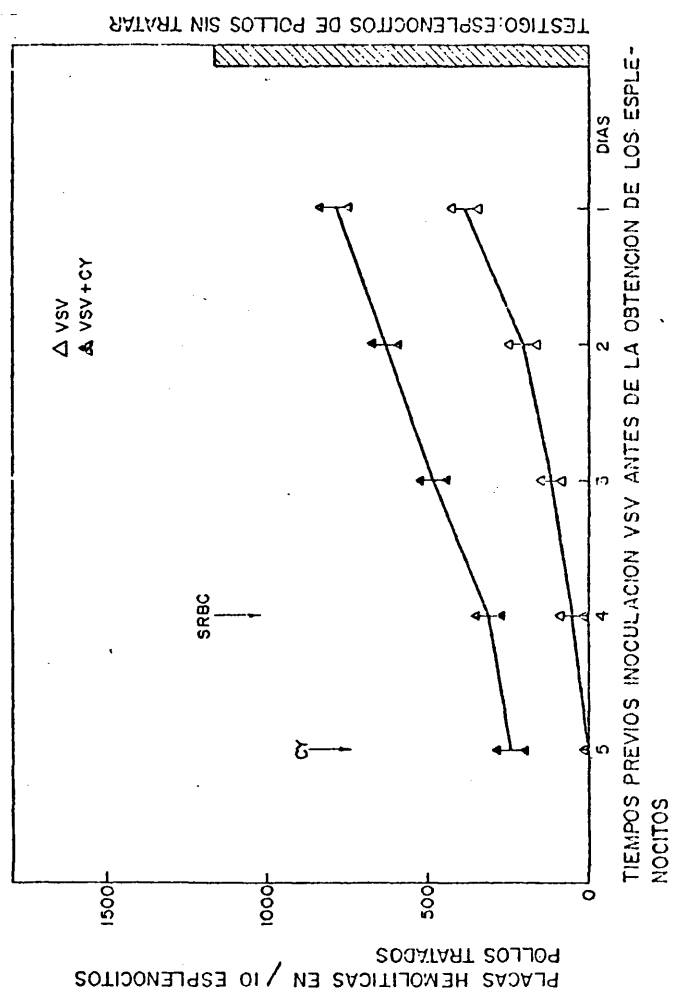


Fig. 58.- Efecto de la ciclofosfamida (CY) en la infección con VSV (100 UFP) a tiempos variables con respecto a la inmunización primaria con SRBC en pollos de dos meses.

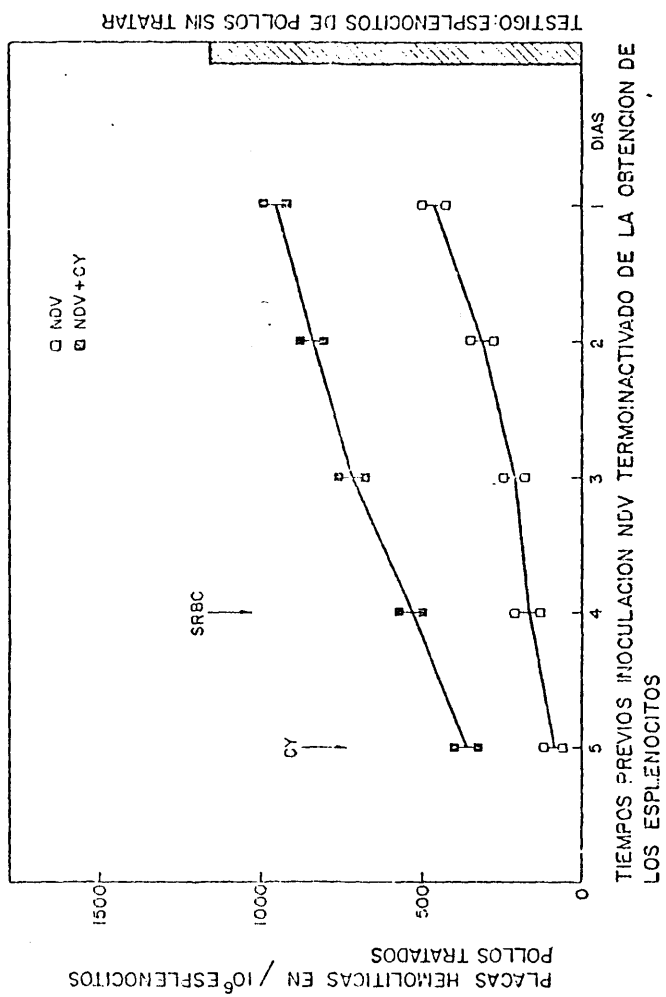


Fig. 59.- Efecto de la ciclofosfamida (CY) en la infección con NDV termoinactivado (1×10^3 DICT) a tiempos variables con respecto a la inmunización primaria con SRBC en pollos de dos meses.

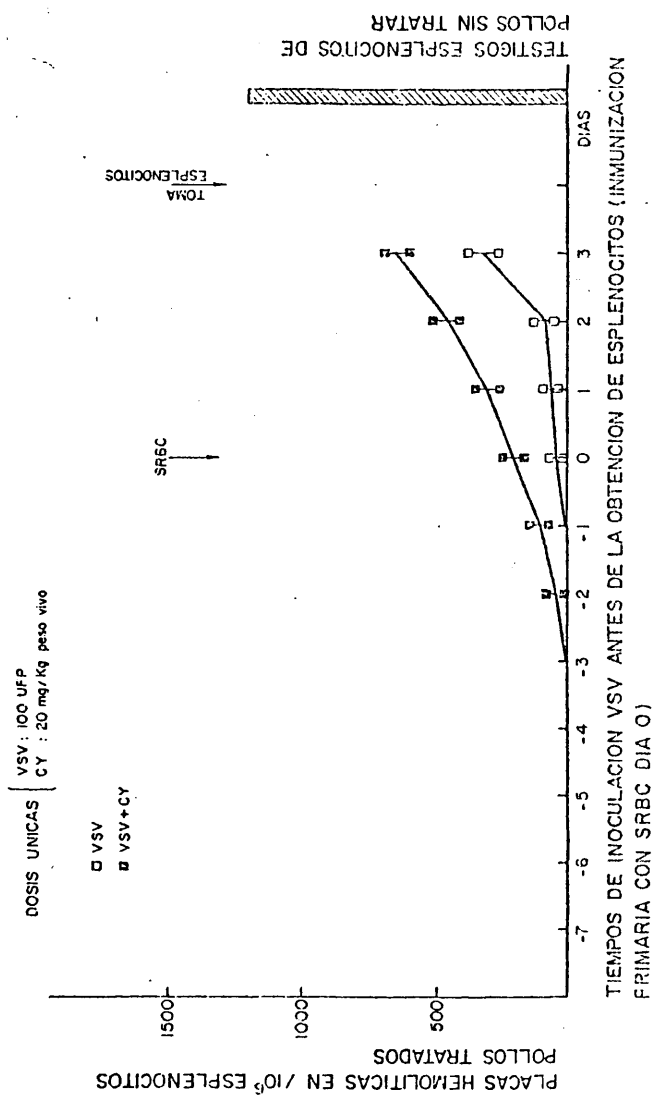


Fig. 60.- Efecto de la ciclofosfamida (CY) en administración simultánea con la infección por VSV a tiempos variables con respecto a la inmunización primaria con SRBC en pollos de dos meses.

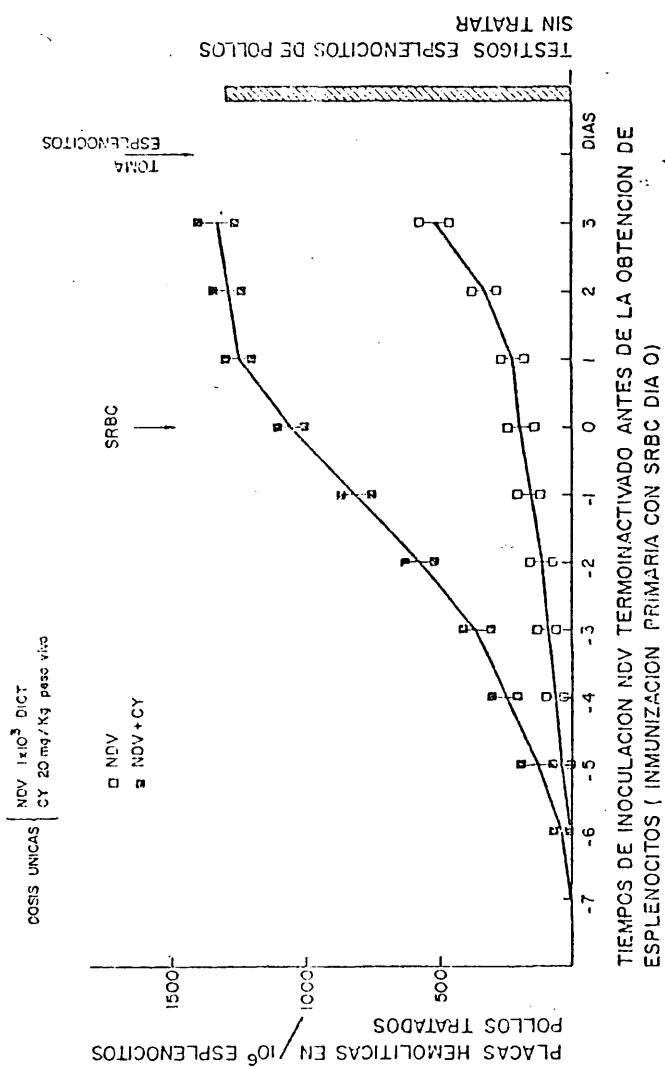


Fig. 61.- Efecto de la ciclofosfamida (CY) en administración simultánea con la infección por NDV termoinactivado a tiempos variables con respecto a la inmunización primaria con SRBC en pollos de dos meses.

si6n que encontramos cuando se inocula s6lo el virus.

Una vez m6s, siguiendo nuestro prop6sito de establecer criterios comparativos en el comportamiento de aves y mam6feros, se realiz6 tambi6n este tipo de experiencias previas sobre rat6n, y as6 podemos ver en los resultados obtenidos con VSV (Fig. 62) y NDV (Fig. 63), sobre estos animales y en experimentos de 1 a 5 d6as, que en presencia de ciclofosfamida tiene lugar una inmunosupresi6n que es menos intensa que la que aparec6a cuando se administraba el virus s6lo; comparando las gr6ficas con las presentadas para pollos, vemos que ambas supresiones siguen comportamientos paralelos tendiendo a aumentar seg6n es mayor el intervalo entre la administraci6n de virus solo o asociado con tratamiento ciclofosf6mico y la obtenci6n de esplenocitos.

Igualmente se realizaron los experimentos para una inmunizaci6n con SRBC de 4 d6as previos a la obtenci6n de los esplenocitos y su tratamiento con VSV (Fig. 64) y NDV (Fig. 65). 6stos se realizaron tambi6n solos o asociados a ciclofosfamida y se establecieron de manera que pod6an ser previos, simult6neos o posteriores a dicha inmunizaci6n con SRBC. Como puede verse, los patrones del comportamiento eran en cierto modo parecidos a los que se produc6an en las pruebas realizadas con pollos, aunque se observan claras diferencias que afectan sobre todo a las experiencias con NDV en los d6as -1, 0 y 1 relativos a la inmunizaci6n.

7.2. Respuesta de interfer6n e inmunitaria en pollos en presencia de ciclofosfamida

Una vez conocidos los par6metros m6s apropiados para la realizaci6n de estos experimentos se dise6n6 el protocolo experimental que se indica en la Fig. 66 aplic6ndolo a pollos re-

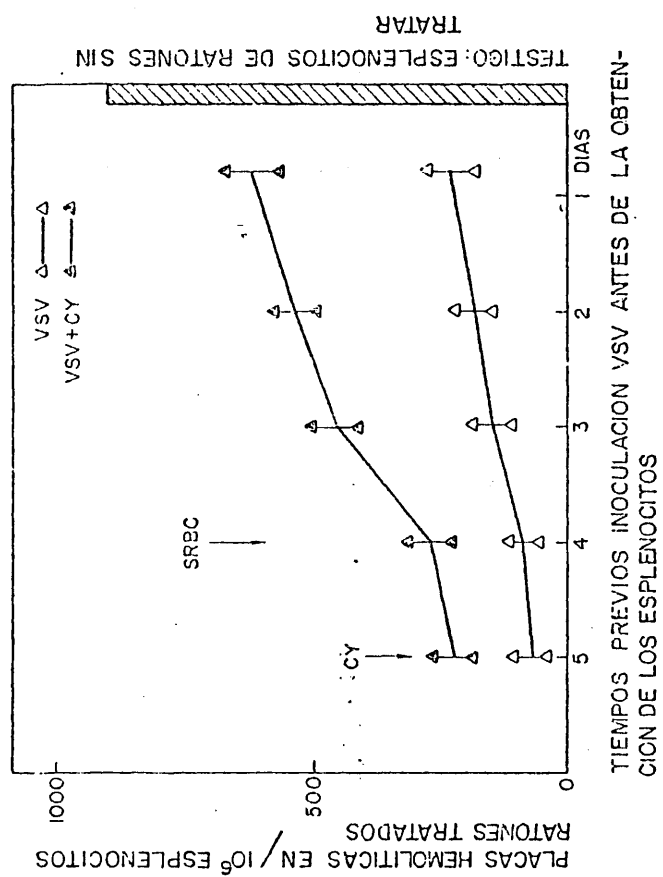


Fig. 62.- Efecto de la ciclofosfamida en la infección con VSV (100 UFP) a tiempos variables con respecto a la inmunización con SRBC en ratones.

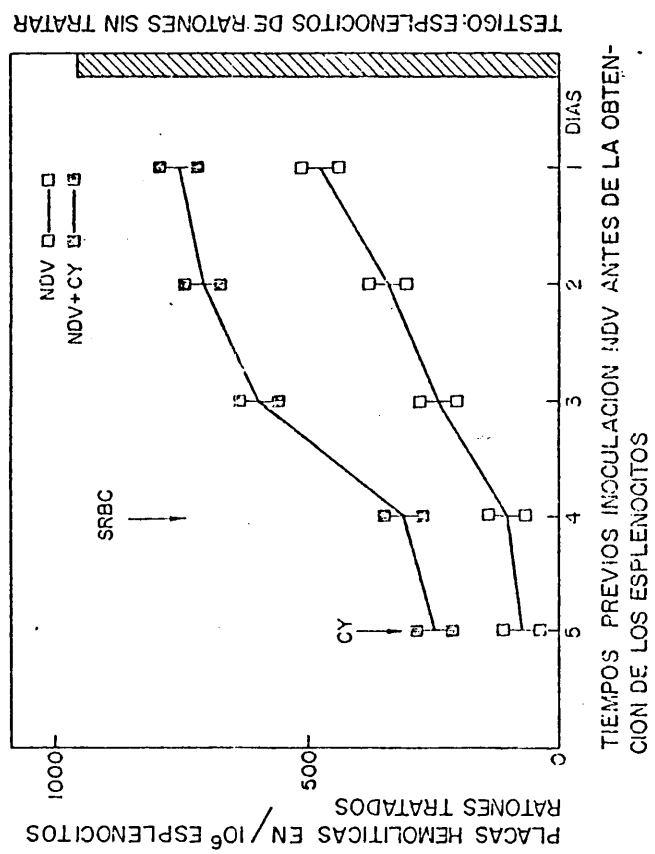


Fig. 63.- Efecto de la ciclofosfamida en la infección con NDV (1×10^3 DICT) a tiempos variables con respecto a la inmunización con SRBC en ratones

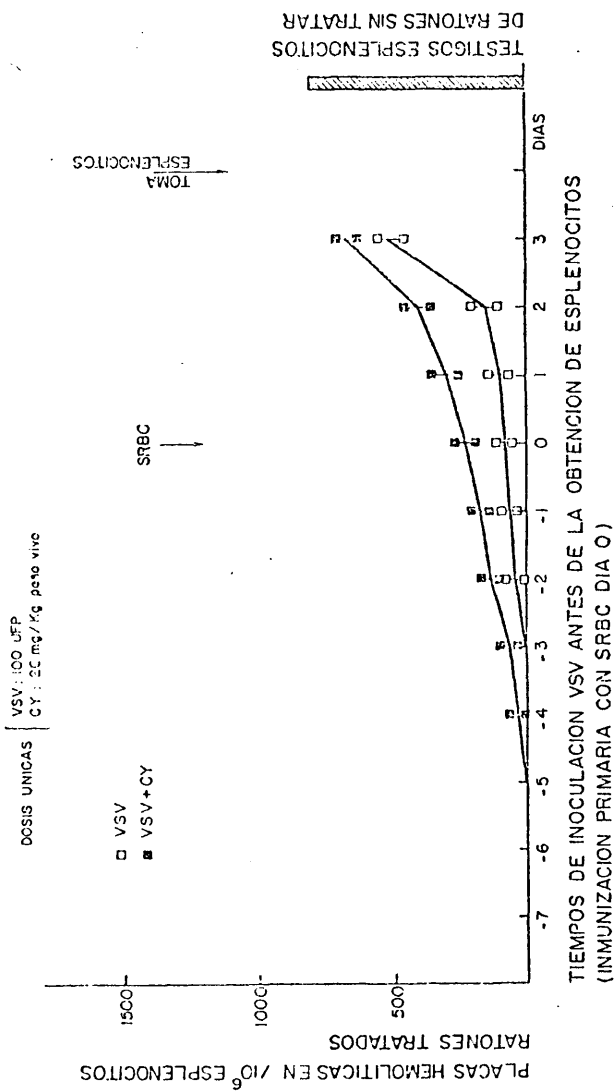


Fig. 64.- Efecto de la ciclofosfamida (CY) en administración simultánea con la infección por VSV (100 UFP) a tiempos variables con respecto a la inmunización primaria con SRBC en ratones.

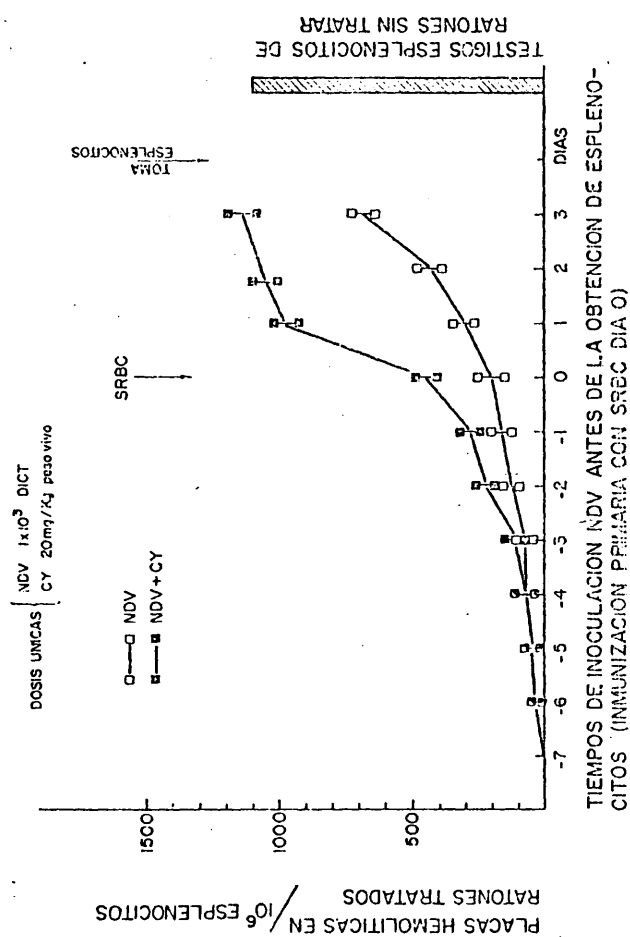


Fig. 65.- Efecto de la ciclofosfamida (CY) en administración simultánea con la infección por NDV (1×10^3 DICT) a tiempos variables con respecto a la inmunización primaria con SRBC en ratones.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

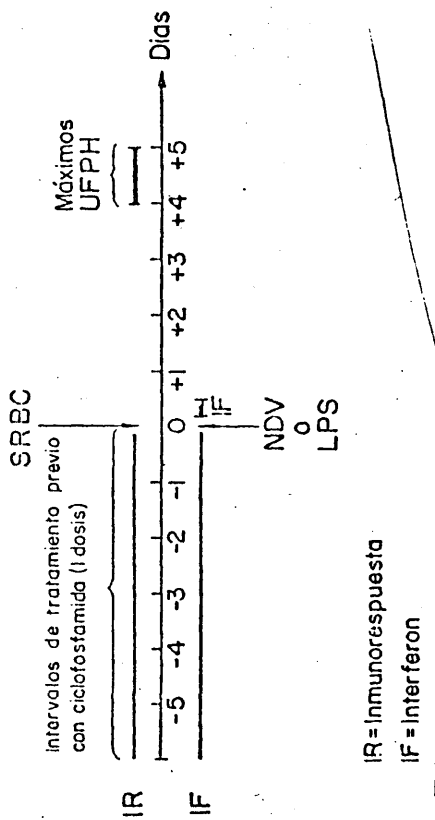


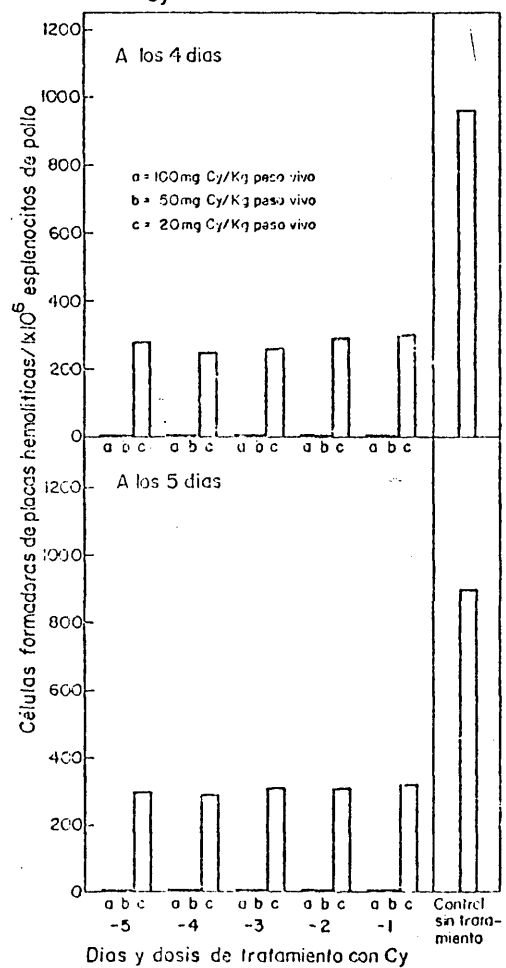
Fig. 66.- Representación gráfica del protocolo experimental en estudios sobre el efecto de varias dosis de ciclofosfamida (CY) en tratamientos previos a la inducción de interferones y a la inmunización con SRBC.

cién nacidos y a otro grupo de 2 meses de edad, con el fin de comprobar si existían diferencias de comportamiento condicionadas por la edad del animal; lo que lleva anejo un mayor grado de desarrollo del sistema inmunitario y con una consiguiente desaparición de los factores transmitidos en el huevo. Así, con intervalos de tratamientos previos de 1 a 5 días y con dosis únicas de ciclofosfamida (100, 50 ó 20 mg/kg peso vivo) se inmunizan los animales con SRBC o se induce el interferón con NDV sin inactivar o con los LPS de B. melitensis y P. aeruginosa.

Posteriormente, se valora la respuesta inmune o de interferón en los momentos que se consideraron óptimos en cada caso: días 4 y 5 para UFPH (FPC) y al cabo de 6 horas para las titulaciones de interferón. Las Figs. 67 y 68, respectivamente, recogen los resultados de las inmunorespuestas obtenidas en pollos recién nacidos y de 2 meses de edad con los valores obtenidos 4 ó 5 días después de la inmunización con SRBC. Como puede verse en el primer caso (Fig. 67), comparando los niveles de UFPH que aparecen en condiciones normales con los resultados obtenidos después de los distintos tratamientos, se puede comprobar que con dosis de 100 y 50 mg se produce una inmunosupresión total en todos los casos, mientras que para la dosis de 20 mg se aprecian inhibiciones parciales del 60 al 70% de la inmunorespuesta normal. Esta inmunosupresión se mantiene invariable, sea cual fuere el intervalo de tratamiento con ciclofosfamida, en los cinco días establecidos antes de la inmunización con SRBC.

En el otro caso (Fig. 68), cuando el experimento se aplica a pollos de 2 meses de edad, se produce como anteriormente, una clara inhibición para dosis de 100 y 50 mg, mientras que con dosis de 20 mg aparece una ligera inhibición para inter-

Fig. 67. - Inmunorespuesta en pollos recién nacidos tratados con diferentes dosis de Cy



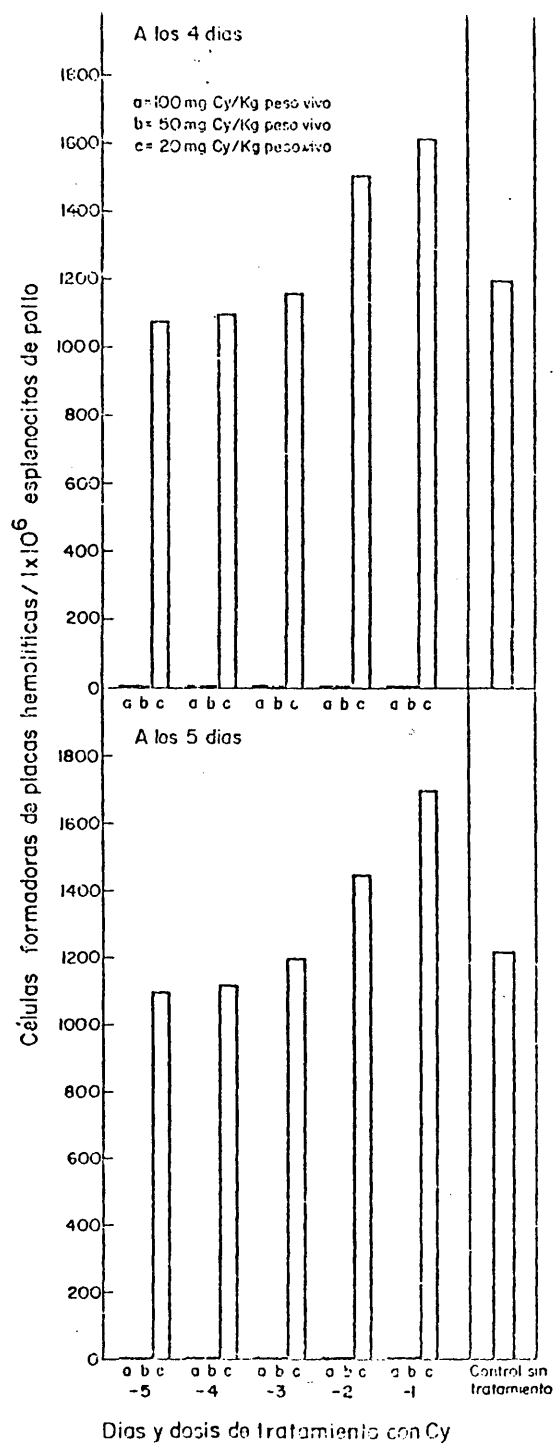


Fig. 68.- Inmunorespuesta en pollos de 2 meses tratados con diferentes dosis de Cy

valos de tratamiento entre 3 y 5 días antes de la inmunización y una inmuoestimulación (de 18% a 31%) cuando esos tratamientos con 20 mg de ciclofosfamida preceden tan sólo en 24 a 48 horas a la inmunización.

Finalmente, los histogramas representados en las Figs. 69 y 70, recogen, respectivamente la respuesta de interferón ante los tres distintos inductores en pollos recién nacidos y de 2 meses de edad sometidos a tratamientos previos con la ciclofosfamida. En este caso no se utilizaron las dosis de 100 mg por considerarla excesiva, ante los datos obtenidos en las pruebas de inmunorespuesta.

Como puede verse, a la derecha del histograma representado en la Fig. 69, aparecen los niveles normales de interferón alcanzados sin ciclofosfamida, que son menores para los inducidos con ambos LPS y de ellos el más bajo nivel corresponde al de B. melitensis. Cuando los pollos recibieron los tratamientos de 50 ó 20 mg se puede ver la inducción con NDV, que si la dosis con el agente alquilante se administra 5 días antes de la inducción se obtienen resultados análogos a los conseguidos cuando se administra el fármaco 24 horas antes; mientras que para la inducción con LPS se obtienen niveles de interferón, ligeramente mayores, a los 5 días que a las 24 horas. Estos niveles van disminuyendo del cuarto al segundo día de tratamiento previo y siendo prácticamente iguales los valores obtenidos entre el segundo y el tercer día antes de la inducción. Cuando se consideran los resultados correspondientes a las 24 horas, en función de los obtenidos anteriormente, se aprecian niveles de interferón, ligeramente mayores, a los 5 días que a las 24 horas. Estos niveles van disminuyendo del cuarto al segundo día de

Fig. 69.- RESPUESTA INTERFERON ANTE DIFERENTES INDUCTORES EN POLLOS RECIENTE NACIDOS SOMETIDOS A TRATAMIENTO PREVIO CON CICLOFOSFAMIDA (Cy)

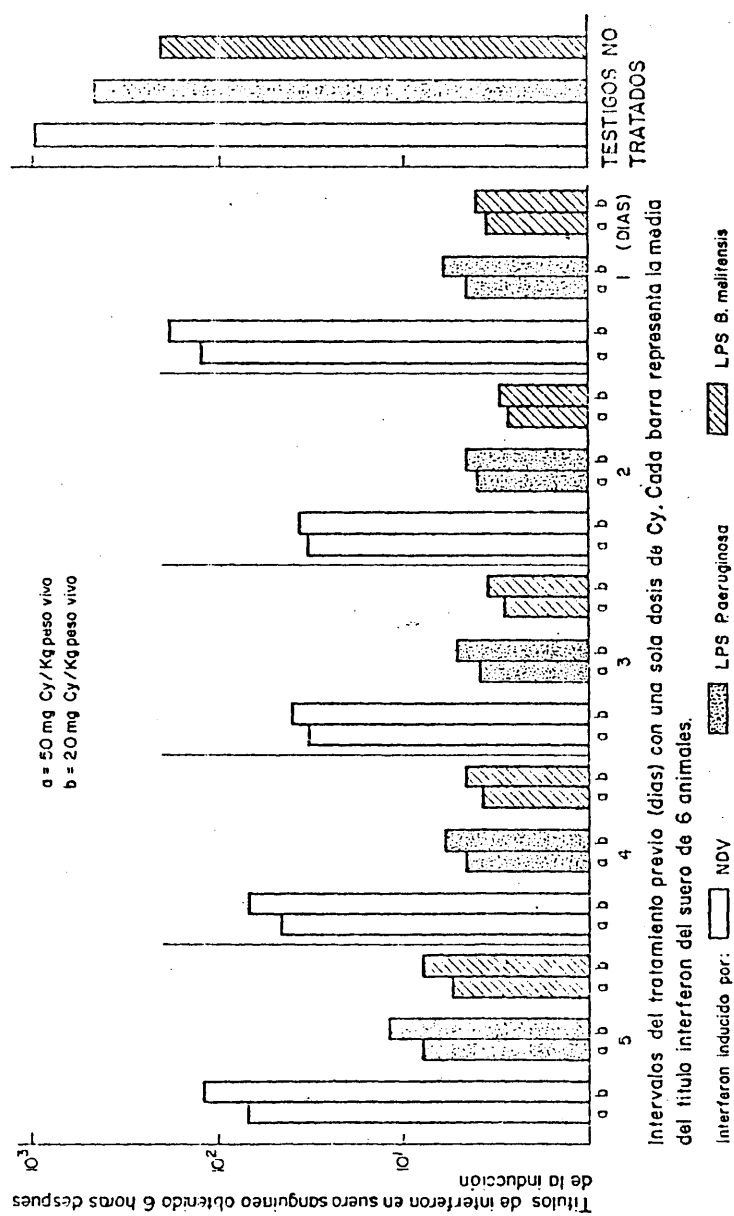
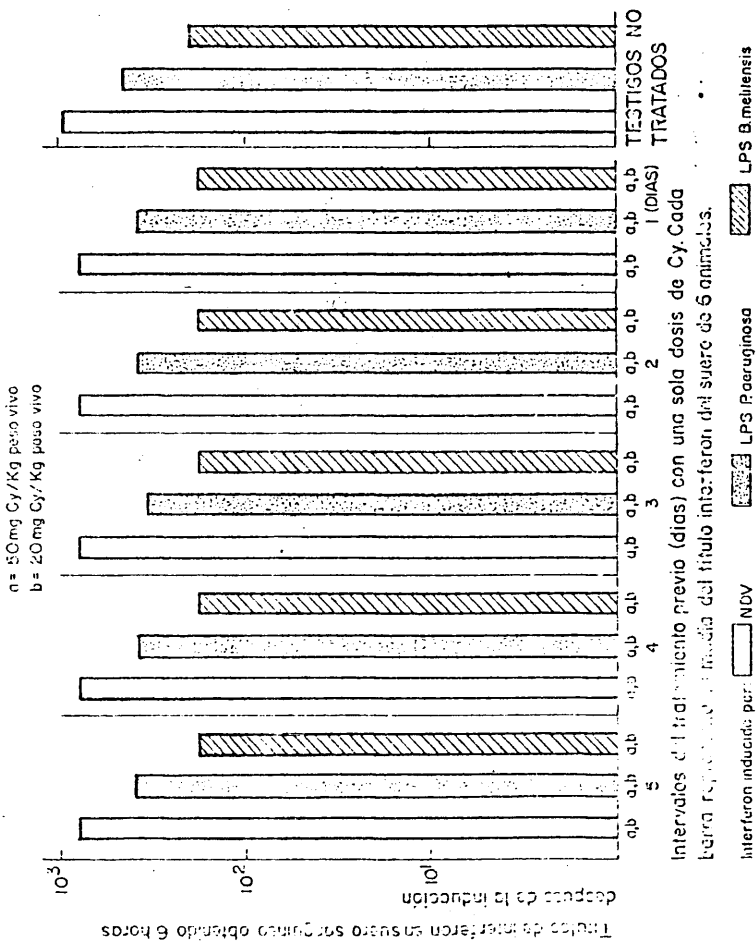


Fig. 70.- - RESPUESTA INTERFERON ANTE DIFERENTES INDUCTORES EN POLLOS DE 2 MESES, SOMETIDOS A TRATAMIENTO PREVIO CON CICLOFOSFAMIDA (Cy)



tratamiento previo y siendo prácticamente iguales los valores obtenidos entre el segundo y el tercer día antes de la inducción. Cuando se consideran los resultados correspondientes a las 24 horas, en función de los obtenidos anteriormente, se aprecian niveles de interferón ligeramente superiores para la inducción por NDV, mientras que los niveles obtenidos con inducción por LPS se mantienen en un estado de depresión semejante al observado en los tres días anteriores.

Cuando el tratamiento se aplica a pollos de 2 meses de edad (Fig. 70), se puede ver que no existe diferencia alguna en función de las dosis de ciclofosfamida y también que la inducción de interferón en animales de esa edad no resulta afectada por el tratamiento ciclofosfamídico para los intervalos establecidos entre 1 y 5 días.

V. CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS

Dado el número de experimentos realizados y los muchos datos a tener en cuenta, este análisis de resultados lo estableceremos desde distintos puntos de vista para considerar por separado, tanto la idoneidad a establecer en los modelos biológicos utilizados como las variaciones en la producción de interferón aviar -ya sea "in vitro" o "in vivo"- en función del agente inductor, del sistema inmunobiológico de respuesta o de la presencia de sustancias que puedan interferir con el comportamiento del huésped; asimismo, estableceremos comparaciones entre la producción de interferón en pollos y ratones o en las células de ambas especies animales y su acción sobre la respuesta inmunitaria del huésped.

1. Acerca de la idoneidad de los sistemas de ensayo

Antes de iniciar los distintos experimentos programados consideramos necesario hacer una serie de ensayos previos que fijaran los parámetros biológicos básicos sobre los que estudiar de modo cierto la significación y variaciones de los resultados. Desde un punto de vista comparativo de ambos sistemas animales (pollos y ratón), nos resulta claro que a nivel de

huesped se deben estudiar, en nuestras condiciones experimentales, las características mas normales de ensayo en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo y la viabilidad celular de fibroblastos de pollo y células L de ratón, por servir de soportes vitales para la producción y titulación de interferón "in vitro".

Así, en cuanto a la viabilidad y supervivencia de fibroblastos de pollo se pueden apreciar tres fases en la curva de crecimiento (Fig. 10); en la primera de ellas, que alcanza hasta las 12 horas, no se pueden planear ensayos por la gran dispersión de resultados que se producen debido a la discontinuidad y estado de agregación del epitelio celular. Tampoco en la última fase de la curva (periodo de 60 horas en adelante) se pueden establecer resultados fiables por el estado de degeneración del cultivo y excesiva acidificación del pH del medio. De aquí que todos los ensayos deban ser establecidos para un periodo de observación comprendido entre 24 y 48 horas.

También, en relación con la viabilidad y supervivencia de células L de ratón, encontramos que este tipo de cultivo celular, -por ser células de línea- permanece inalterado durante un tiempo relativamente prolongado; ello no obstante, los ensayos deben realizarse asimismo, entre 24 y 48 horas. Sin embargo este cultivo celular permite obviar la acidificación del medio reemplazándolo, cuando se requiera, por otro a pH 7,2.

La vitalidad de la membrana corioalantoidea, estudiada durante periodos totales de 4 a 5 días, presenta alteraciones comprobables, incluso macroscopicamente, pasadas las 60 horas después de su puesta en cultivo, lo que nos indujo a emplearla entre las 12 y 36 horas; periodo en el que sirven perfectamente

como sustrato para la multiplicación de los mixovirus empleados.

Cuando estos ensayos previos se consideran a nivel del agente viral infeccioso hay que tener en cuenta la actividad biológica y la sensibilidad. En cuanto a la primera, las Figs. 11 a 14 dan idea de los distintos grados de destrucción celular producida por el FPV sobre fibroblastos; sin embargo estas imágenes son absolutamente iguales para cada uno de los otros mixovirus utilizados en nuestros experimentos, siendo imposible identificar por sus efectos citopáticos de qué virus se trata de no conocer su origen.

De aquí que, en nuestras condiciones experimentales, se consideraron inóculos óptimos de infectividad viral de 6×10^3 a 1×10^4 DICT₅₀ para cualquiera de los virus empleados.

La termosensibilidad a 37° C (pH 6 y 7,2) de los distintos virus ensayados, determinada mediante pruebas de poder citopático y hemaglutinante, reveló algunas variaciones en función de las actividades estudiadas.

La actividad infectiva desaparece, en medio exento de sustrato celular a ambos pH, a las 48 horas, pudiendo destacar el bajo poder infectivo del virus influenza a las 24 horas; que este permanece mas alto para los otros tres mixovirus en esta determinación. El pH 6, para los cuatro virus considerados, produce una más rápida inactivación según se puede comprobar en la determinación de 24 horas.

La actividad hemaglutinante, sin embargo, se comporta de diferente manera; en las primeras 24 horas presenta un descenso de 1 ó 2 unidades logarítmicas de base 2, para permanecer constante a partir de este momento hasta las 96 horas en que se dió por finalizado el experimento. Por tanto, la actividad hemaglutinante es un buen parámetro que reemplaza con ventaja a la actividad infectiva para llevar a cabo las pruebas de titulación de interferón sobre membrana corioalantoidea.

2. Variaciones en la inducción de interferón en pollos

Según los resultados obtenidos en suero sanguíneo de pollo, reseñados en el Cuadro V, al inducir el interferón "in vivo" y en cuanto se refiere a la naturaleza del inductor, nos encontramos con que los títulos más altos se han obtenido mediante el uso de la tilorona (administrada por vía oral a dosis de 0,3 mg/10 gr de peso vivo). Resultados de los que no existen antecedentes en la extensa bibliografía consultada.

Los dos virus utilizados han dado lugar a una muy diversa producción de interferón, ya que el NDV ha originado 20 veces mas interferón que el VSV, pese a haber utilizado ambos virus en condiciones semejantes de infectividad. En cuanto a los LPS, vemos que la endotoxina de P. aeruginosa es ligeramente mejor inductor de interferón que la del B. melitensis dependiendo directamente el título de interferón de la cantidad de LPS inoculado en cada caso.

En relación con la cinética de aparición del interferón en pollos habremos de considerar *el tiempo de obtención de suero* y los niveles alcanzados, así hemos observado que los títulos más altos se obtienen en los experimentos con la tilorona, 24 horas más tarde de la administración de la droga, mientras que

para los virus y las endotoxinas, los títulos más altos aparecen entre 4 y 8 horas después de su inoculación por vía intravenosa.

En cuanto se refiere al *método de titulación* hemos conseguido los mejores resultados utilizando el método de Dulbecco, mediante observación de la reducción de placas infectivas producidas por el VSV, que con el uso del método de Fulton y Armitage que se funda en la disminución del poder hemaglutinante de virus que poseen esta característica biológica.

Si pasamos a considerar los resultados obtenidos "in vitro" sobre fibroblastos y esplenocitos, nos encontramos con que en ambos tipos de células el mejor inductor de interferón ha sido el NDV, mientras que la endotoxina de B. melitensis ha producido los títulos más bajos. Por otra parte, tenemos que destacar, que en las pruebas "in vitro", no es posible la utilización de la tilorona. Tanto en las pruebas "in vivo" como "in vitro", el NDV se ha comportado como mejor inductor del interferón que el VSV; mientras que éste último virus, resulta un excelente material biológico como virus interferido en las pruebas del método de Dulbecco (reducción de placas infectivas)

Dado los propósitos comparativos con los que emprendimos la presente Memoria y al estudiar en el Cuadro X los títulos de interferón obtenidos con los distintos inductores sobre huésped murino, con las mismas dosis que se utilizaron en huésped aviar (excluyendo el VSV por su poca capacidad productora de interferón) encontramos que la tilorona es también "in vivo" el mejor inductor, seguido por el NDV y siendo el menos activo el LPS de B. melitensis; es decir, que en dichas pruebas se han obtenido resultados que siguen, por tanto, el mismo orden de similitud que el aparecido en el sistema aviar. Podemos considerar

por tanto que excepto en el caso de la tilorona, con la que se obtiene una producción de interferón mayor del 50% en sistema murino en relación con el sistema aviar (y volvemos a destacar nuestra aportación en este campo) el resto de los inductores han dado lugar a valores que se aproximan bastante en ambos sistemas biológicos.

3. Efecto de una virus-sensibilización previa en la inducción de interferón.

Como una aproximación mas a la problematica de modulación del interferón hemos realizado experiencias "in vitro" en las que pensamos en la posible influencia de una sensibilización celular por infección previa del animal con el virus que más tarde utilizaríamos como inductor. De este modo, las células podrían presentar una reacción equivalente a una respuesta secundaria. Efectivamente, cuando estudiamos la inducción de interferón "in vivo", encontramos en la bibliografía (entre los que existen también otros trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio) que ciertas aves que habían sido sometidas a infecciones repetidas por NDV para la obtención de sueros hiperinmunes presentaban títulos de interferón en suero ligeramente más alto que los obtenidos en otros grupos de aves que no habían sufrido una infección anterior. Una de las condiciones necesarias para esta mayor inducción del interferón era que hubiera pasado un cierto intervalo de tiempo entre la primera dosis infectiva y la segunda que podíamos llamar inductora o estimulante; por la experiencia adquirida en nuestro laboratorio sabíamos que la primera dosis era capaz de inducir interferón pero el efecto de una segunda dosis aún no había sido estudiado a fondo.

Según esto, los primeros resultados eran confirmatorios de una mayor presencia de interferón en suero sanguíneo de las aves reinfectadas, tanto con virus termoinactivados como activos, y es entonces cuando comenzamos los experimentos necesarios para el estudio del comportamiento de esplenocitos procedentes de pollos infectados en inoculación única o repetida con NDV ó FPV inactivado con BPL (precaución imprescindible dado el alto poder letal de estos virus para las gallináceas). Así los esplenocitos procedentes de aves previamente inmunizadas con NDV fueron infectados con este mismo virus o con FPV y lo mismo se hizo con los esplenocitos de aves también inmunizadas con FPV; de aquí que los esplenocitos quedarán sometidos a infección por ambos virus, tanto termoinactivados como no inactivados, según la serie experimental correspondiente.

Considerando los resultados obtenidos nos encontramos que tanto los esplenocitos previamente sensibilizados, como los que no lo habían sido, eran capaces de producir interferón (Figs. 27 y 28); pero siempre los títulos más altos correspondían a interferón inducido sobre esplenocitos previamente sensibilizados, excepto cuando tan sólo había un intervalo de 7 días entre la infección sensibilizante y la estimulante. En estos casos encontramos valores semejantes tanto si los virus habían sido o no termoinactivados; por otra parte cuando establecíamos intervalos de 14 a 28 días se daba lugar a la aparición de títulos que llegaban a ser hasta tres veces más altos en la virus-sensibilización previa, especialmente si se considera el FPV actuando sobre esplenocitos sensibilizados con el mismo antígeno

Si comparamos el comportamiento de estos virus con respecto a un estado de actividad en el momento de la inducción veremos que la termoinactivación permite una mayor producción

de interferón; comportamiento lógico si se considera que ambos virus tienen un alto poder citopático que altera rápidamente la fisiología celular y este hecho ya fue señalado y considerado por nosotros anteriormente. Experimentos posteriores, que no han sido incluidos en estos resultados, indican que a partir de la segunda dosis de sensibilización tiene más efectividad el intervalo entre sensibilización y obtención de esplenocitos para la subsiguiente infección que pueda tenerlo la repetición de dosis sensibilizadoras. En todo caso los mayores rendimientos se han obtenido en las estimulaciones con el virus homólogo, aunque también hayamos encontrado siempre una mayor producción en células sensibilizadas con el virus heterólogo que en aquellos casos en que se emplearon células no sensibilizadas. Este comportamiento nos permite confirmar una vez más la estrecha relación entre los ortho y paramixovirus, incluso en sus acciones como sensibilizante celular e inductora de interferón.

Considerando estos resultados reveladores del parentesco antigénico entre los mixovirus hicimos unas pruebas de transformación linfoblástica medida por la incorporación de ^3H -timidina sensibilizando pollos con ambos virus FPV y NDV y enfrentando los esplenocitos procedentes de estos animales en pruebas de estimulación cruzadas entre ellos mismos y otros componentes de los grupos ortho (influenza-FIU) y paramixovirus (Sendai) incluyendo, además, un virus completamente ajeno a los mixovirus como es el virus de la encefalitis equina Este, que forma parte del grupo arbovirus. En el Cuadro IX los resultados nos indican una efectiva sensibilización de los esplenocitos, con valores más altos que los obtenidos en blastogénesis inducidas por lectinas, en aquellos casos en que coincidía el virus sensibilizante con el estimulante; también resulta más elevada la incorporación de timidina en los casos de esplenocitos sensibilizados y estimulados con virus del mismo grupo. Los virus estimulantes termoinactivados han dado lugar a incorporaciones más altas de timidina, lo cual es lógico si se tiene en cuenta que los virus

activos dan lugar a infecciones de los esplenocitos con la citolisis correspondiente.

El virus encefalítico. Este, que actuó como testigo, proporcionó valores siempre mas bajos que los obtenidos en las sensibilizaciones con virus homólogos o del mismo grupo viral. Los resultados que se presentan corresponden a una sensibilización con tres dosis de virus espaciadas por un intervalo de siete días; mayor número de dosis sensibilizantes no aumentan los valores obtenidos con tres dosis, mientras que una o dos dosis no son capaces de producir una sensibilización aparente.

Como estábamos interesados por conocer con mas detalle la actividad de los esplenocitos sensibilizados en relación con la infectividad del virus, que en nuestro caso dá lugar a valores más bajos en la incorporación de timidina cuando se comparan con los obtenidos en presencia de virus inactivados, emprendimos un estudio en el que enfrentamos con NDV ó FPV las células sensibilizadas por uno u otro de ambos virus en 1, 2, 3 ó 4 dosis y observamos (Fig. 29) que cuando los animales habian recibido 3 dosis sensibilizantes, sus esplenocitos eran capaces de neutralizar por completo la infectividad del virus estimulante (NDV \longrightarrow NDV; FPV \longrightarrow FPV) y disminuir sensiblemente la infectividad del otro virus (NDV \longleftrightarrow FPV).

Al comparar los estudios anteriormente reseñados y trasladando la misma metodología al comportamiento de esplenocitos murinos obtuvimos interferón sobre dichas células sensibilizadas con NDV ó FPV; en este caso particular utilizamos los virus sin inactivar con BPL, dado que los ratones no presentan cuadros patológicos consecuentes con la infección por

estos virus, y poniendo en contacto los esplenocitos con uno u otro de ambos virus ya sean termoinactivados o no (Figs. 30 y 31). Los títulos de interferón obtenidos son muy semejantes a los que aparecieron en los experimentos anteriormente estudiados con esplenocitos aviares; en este caso, hemos encontrado, también, que el virus inductor termoinactivado da lugar a mayores títulos de interferón que cuando actúa sin inactivar.

Este comportamiento, tanto en esplenocitos aviares como murinos, así como la consideración de que sensibilizaciones con tres dosis son capaces de neutralizar la infectividad del virus nos lleva a considerar la inactivación del virus inductor como un factor positivo en la producción de interferón, aunque esta observación pueda particularizarse a los virus empleados por nosotros y no deba tomarse como regla general en cualquier otro agente viral.

Al igual que se realizó en pollos se hicieron pruebas de sensibilización cruzada sobre esplenocitos murinos. Los resultados que aparecen en el Cuadro XII indican una fuerte sensibilización por los virus homotípicos puros (NDV \longrightarrow NDV; FPV \longrightarrow FPV) que también resulta destacable en los casos de homotípicos simples (NDV \longrightarrow Sendai; entre los paramixovirus; FPV \longrightarrow influenza (FLU) entre los orthomixovirus). Se pueden considerar como positivos los valores de incorporación de timidina obtenidos en la sensibilización cruzada entre los ortho y paramixovirus cuando se comparan los valores obtenidos en presencia del virus EEE, como ejemplo de virus no emparentado. Tanto en las pruebas con esplenocitos aviares como con esplenocitos murinos los testigos de estimulación blástica inducida por lectinas sirvieron de patrones de actividad de estas células.

Así estudiados los resultados parece lógico considerar, por tanto, que este método de sensibilización puede resultar útil en la determinación del parentesco biológico, o al menos antigénico, de los virus. También es preciso señalar que con esplenocitos murinos no hemos podido llevar a cabo las pruebas de neutralización de infectividad de los virus estimulantes dado la ausencia de multiplicación de los mixovirus en dichas células de ratón.

4. Efecto del interferón exógeno "in vivo" e "in vitro" sobre la respuesta inmunitaria del huésped

Dado el gran número de datos obtenidos y los muchos experimentos realizados de acuerdo con diferentes modelos biológicos de estudio "in vivo" e "in vitro", no es fácil considerar estos resultados con una visión unitaria del problema. Por tanto haremos distinción en nuestras consideraciones según se trate de experimentos "in vivo" o "in vitro". Después, en el último apartado, se considerarán conjuntamente al comparar todas las respuestas en función de la especie animal (aviar o murina) utilizada en el estudio.

4.1. Los efectos "in vivo"

Se ensayaron desde dos puntos de vista; de este modo, según que se estudiara la respuesta blastogénica o la cinética de aparición de células inmunocompetentes capaces de formar IgM, podíamos obtener datos del efecto del interferón exógeno sobre las fases previas de proliferación linfóide o sobre los estudios finales en que aparecen ya sintetizadas las IgM.

En el primer caso, a partir de animales previamente inmunizados y que habían recibido tratamiento o no con distintas dosis de interferón exógeno, se obtienen los esplenocitos y se estudian sus respuestas frente a la activación por PHA y Con A. En estas condiciones se estudian las variaciones de incorporación de timidina según que se implanten o no tratamientos previos a la inmunización primaria anti-SRBC desde los 20 a 2 días antes. Así pudimos comprobar que, tanto en pollos como en ratones, las respuestas frente a ambos mitógenos siguen patrones análogos, aunque la respuesta frente a Con A sea siempre más alta, lo cual puede ser debido a la diferente sensibilidad de los linfocitos T en ambas especies, ya que en ratones las diferencias son bastante menos acusadas en todos los ensayos (Figs.32 a 37) o a otras particularidades señaladas en el apartado 5.

En todos los casos se detecta una inhibición de grado variable sobre la blastogénesis según las circunstancias experimentales, aunque en todos los casos se aprecia la influencia de la dosis y el momento de administración del interferón. Con las dosis más elevadas (2.500 UI) aparece la máxima inhibición (en todos los casos prácticamente entre los 14 y 16 días previos a la inmunización) mientras que con dosis más pequeñas (500 y 1.000) la inhibición blastogénica de intensidad variable se empieza a manifestar hacia los 10 días antes de la inmunización. Este fenómeno nos lleva a pensar que existe una dosis óptima que está entre las dosis de 1.000 y 2.500 U a la que se llega administrando las concentraciones más altas después de un proceso de degradación o bloqueo del interferón, que es continuado y que resulta menos patente en los intervalos inferiores a 6 días. En cualquier caso el fenómeno nos parece de gran interés y mere-

una mas detallada atención en sucesivos experimentos.

En cuanto a las variaciones que se aprecian considerando la naturaleza del interferón, se han de destacar algunas pequeñas diferencias de intensidad en los efectos antes apuntados, que son algo mas patentes en pollos que en ratones, cuando se compara aisladamente cada experimento con el correspondiente endósis y días de administración; aunque en ratones, sin embargo, se aprecia que el interferón inducido por LPS de B. melitensis es un inhibidor menos activo para las dosis de 1.000 y 500 U. Así, una vez más y desde otro punto de vista, aparece la noción de una dosis óptima que estaría sometida a menores variaciones en un grado de intensidad, según el momento de inoculación y el animal de ensayo utilizado.

Encuanto al efecto "in vivo" del interferón exógeno para los estadios finales de una inmuno-respuesta primaria anti-SRBC, fue comprobado a través de las variaciones producidas en el número de células formadoras de IgM y precisamente sobre animales a los que se habia administrado antes de la inoculación del antígeno (SRBC) distintas dosis de interferón (500, 1.000 y 2.500 U/10 gr peso vivo). En las pruebas sobre esplenocitos aviares, antes de comenzar los experimentos definitivos y dado que se trataba de una especie animal de la que no teniamos antecedentes de su comportamiento, tuvimos que realizar unos ensayos previos que nos permitieran establecer la dosis mínima de antígeno eritrocítico para alcanzar una inmuno-respuesta primaria idónea para nuestros propósitos y también fijar las características del complemento a utilizar puesto que complemento aviar sólo o de ratón, o cobaya, no daban buenos resultados. Así comprobamos que con dosis superiores a 1 ml y con una concentración

de 8×10^7 células no aparecían incrementos de respuesta en el número de PFC, mientras que dosis antigénicas inferiores a los 6×10^7 eritrocitos producían respuestas mas bajas en las que después era más difícil medir las variaciones (Fig. 38). En relación con la naturaleza del complemento, de las cinco muestras ensayadas mezclando complemento aviar y de cobaya (Fig. 39) obtuvimos los mejores resultados añadiendo a 1 volúmen de suero de pollo 4 volúmenes de suero de cobaya y utilizando esta mezcla como reactivo amboceptor. En estas condiciones de ensayo las Figs. 40 a 45, ambas inclusive, muestran que en presencia de interferón se produce una inmunodepresión variable: a) en función de la naturaleza y dosis del interferón administrado; b) de acuerdo con el momento en que se administra el interferón en relación con el momento de la inmunización; y c) según la especie animal de ensayo.

Efectivamente, en todos los casos sin excepción aparece una mayor depresión inmunitaria cuando se emplea interferón virus-inducido que cuando está inducido por endotoxinas y también el tanto por ciento de reducción de PFC varía de acuerdo con la dosis, pero según el momento de su inoculación relativa al antígeno. Así, cuando el interferón se administra de 8 a 10 días (según los casos) antes del antígeno SRBC, se observa una proporcionalidad de la dosis y tanto por ciento de supresión; es decir, se podría establecer una curva de dosis respuesta para cada día; pero cuando los intervalos entre inmunización y tratamiento con interferón son superiores a 10 días no aparece supresión con 500 ó 1.000 U de interferón, mientras que con la dosis mas alta (2.500 U) hay un aumento en el tanto por ciento de reducción de PFC que empieza a disminuir después de las dos semanas aproximadamente. Esta curva de disminución de la actividad inmunosupresora es más patente en ratones y para interferón inducido por NDV.

Con pollos la inmunodepresión es bastante menos acusada que en ratones, sobre todo con los interferones inducidos por endotoxinas, y quizá ello sea debido a que estos animales poseen un sistema bursal mas desarrollado y por tanto mas resistente a sufrir modificaciones.

Lo que también parece claro en estos resultados es que a pesar de que el interferón sea administrado en iguales dosis hay una diferencia de graduación en su comportamiento entre el inducido por NDV o los inducidos por LPS; ello se debe a que el primero responde a una inducción en todas las células del organismo mientras que los otros interferones son generados en linfocitos manteniendo, debido a este diverso origen, una diversa actividad tanto biológica como en sus características fisico-químicas. De todos modos, sea cual fuere su procedencia el interferón es totalmente degradado o inactivado por el organismo huésped en un tiempo variable según la dosis que se administre y para lograr una supresión de la inmuno-respuesta anti-SRBC que sea efectiva al cien por cien es necesario administrar una dosis suficiente para que, aunque vaya siendo degradada por el huésped, se mantenga la dosis activa mínima durante 11 a 14 días según el animal de ensayo y el origen del interferón.

4.2. Por otra parte, para conocer los efectos "in vitro" del interferón, utilizamos esplenocitos de pollos y ratones (previamente inmunizados "in vivo") y obteniéndolos del animal en el momento en que sabíamos que se encontraban en su máximo de inmunorespuesta, que para nuestras condiciones experimentales se produce entre el cuarto y quinto día.

Sobre estos cultivos de esplenocitos con capacidad funcional (Figs. 46 y 47) demostrada, se instauraron tratamientos "in vitro" con las tres dosis de interferón antes mencionadas y se hicieron actuar durante intervalos de 1 a 10 horas a 4° C; al cabo de este tiempo, se determinaron las variaciones para formar placas hemolíticas (es decir células formadoras de IgM) y también los niveles de incorporación de ³H-timidina en presencia de mitógenos (activación policlonal). En todos los casos se establecieron lotes testigo con "falso" interferón.

En estos ensayos tuvimos ocasión de comprobar que el efecto "in vitro" es semejante al obtenido "in vivo", aunque mucho menos intenso, hasta el punto de que dosis inferiores a 1.500 U, según comprobamos, (datos no presentados) no producían ninguna acción sobre las células formadoras de placas por anticuerpos IgM. Así se comprueba que, en todos los casos ensayados con 2.500 U interferón, siempre aparece una depresión de la immuno-respuesta primaria anti-SRBC y que este efecto es variable según el origen del interferón, el tiempo de contacto y el animal de ensayo.

Los esplenocitos de pollo, a igualdad de tiempo de contacto efectivo (8 a 10 horas), son mas resistentes que los esplenocitos de ratón a la acción inmunodepresora del interferón; antes apuntábamos que podría ser debido a diferencias de complejidad en el sistema inmunitario de ambas especies, pero también pensamos en que posiblemente existan diferencias específicas particulares entre los mecanismos de regulación de ambos sistemas inmunitarios.

En todos estos casos se aprecia que es mucho más efectivo el interferón viral; y de los endotoxín-inducidos, el menos activo fué el correspondiente al LPS de Pseudomonas mientras que en las pruebas in vivo el menos activo resultó ser el interferón inducido por LPS de Brucella. Una vez más también se aprecia "in vitro" la idoneidad de dosis, tiempos de acción y de naturaleza del interferón.

Cuando la acción "in vitro" del interferón sobre los estadios tempranos de la respuesta inmune se mide en función de la activación policlonal (Figs. 48 y 49), se comprueba que la respuesta con PHA es menos intensa que la presentada frente a Con A y el efecto más patente aparece en todos los casos después de contactos de 7 a 8 horas. En todas estas experiencias no se ha empleado la estimulación de linfocitos B por LPS con el fin de evitar la intervención de otros factores derivados de que estas sustancias hayan sido también responsables de la inducción de interferón.

Aunque la estimulación mitogénica fue claramente menor en pollos que en ratones (una vez más se muestran las diferencias de especie) sin embargo, la inhibición relativa de la respuesta fue semejante en ambos casos e incluso considerando el patrón tiempo ya que se observa un máximo de indiferencia en la acción a las 6 horas; también vemos que el orden de actividad, de mayor a menor, fue interferón viral seguido de interferón inducido por LPS de B. melitensis e interferón inducido por P. aeruginosa. Este orden de mayor a menor resulta ser el mismo que el que se obtuvo en las determinaciones "in vitro" empleando el método de incorporación de ³H-timidina. Sin embargo, insistimos, el orden que se ha observado en las pruebas

"in vivo" fue el de interferón inducido por virus en primer lugar y va seguido por interferón inducido por P. aeruginosa y luego por interferón inducido por B. melitensis; lo cual parece indicar que pueden aparecer algunas diferencias por la intervención de otros mecanismos de inmuno-respuesta en el organismo "in vivo".

5. Efecto de un inductor sintético de interferón

En un estudio comparativo de la producción de interferón, sobre ratones y pollos, parece obligado ensayar además de inductores biológicos del tipo más clásico (virus y moléculas endotóxicas), un inductor sintético que, por otra parte, es el único capaz de inducir interferón por vía oral y del que no tenemos noticia de que haya sido utilizado en aves. Ello nos hace pensar que este interferón se produce, muy posiblemente, a través de estructuras linfoides de localización intestinal. En relación con esta hipótesis, ya KRUEGER y MAEYER en 1970, apuntaban la posibilidad de que la tilorona actuara del mismo modo que los LPS, es decir sobre los linfocitos B y dando lugar a un interferón de tipo I o clásico, como parece deducirse sobre todo por su termoestabilidad a pH 2; ello hace aún más interesante la posibilidad de observar qué interacciones o relación puede existir entre la producción de interferón y la respuesta inmunitaria del huésped.

Antes de nada fue necesario conocer, tanto en pollos como en ratones, cual es la respuesta normal en niveles de interferón que se pudieran producir como respuesta a tratamientos orales de dosis únicas o por dosis repetidas de 0,3 mg/10 gr de peso vivo (administración mediante sonda esofágica) durante un

intervalo de uno a cinco días; de este modo cabe la posibilidad de relacionar la inducción de interferón con la aparición del máximo de una inmunorespuesta primaria anti-SRBC que aparece al cuarto o quinto día después de la inmunización con eritrocitos de carnero. Con este fin se han hecho pruebas en intervalos de uno a diez días antes de la inmunización con estos eritrocitos, pero aportando la tilorona en el agua de bebida en concentración de 0,3 mg/ml de agua.

Llama la atención el hecho de que no aparecía dispersión de resultados en las pruebas repetidas en los distintos animales que recibieron el tratamiento mediante el agua de bebida; ello significa que las dosis empleadas cubrían las necesidades mínimas para inducir interferón y que todos los animales al utilizar el agua "ad libitum", ingirieron volúmenes líquidos normales con lo que no se llegaron a producir diferencias significativas en las respuestas.

Si consideramos los resultados expresados en las Figs. 50 y 51 parece claro que la respuesta en la especie murina es superior a la aviar, sobre todo en cuanto se refiere a las dosis repetidas. Los patrones de comportamiento parecen ser semejantes en ambos casos, ya que para los tratamientos con dosis únicas, la máxima respuesta se obtiene a las 24 horas antes de la sangría mientras que en los tratamientos repetidos, el nivel máximo se obtiene cuando se administra durante los cinco días, aunque en todos los casos este nivel sea inferior al que se obtenía cuando la droga se administra 24 horas antes de la toma de muestra del suero. Con estos datos como base, se estudiaron las respuestas de inducción de interferón así como el número de células inmuno-competentes formadoras de IgM cuando los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal con 0,1 ml de una suspensión de eritrocitos equivalente a 8×10^6 células, en tanto que los pollos fueron

inmunizados por la misma vía con 1 ml de suspensión 8×10^7 eritrocitos. Estos valores han sido siempre los mismos en todos los experimentos llevados a cabo en la realización de la presente Memoria y de estas cantidades se ha sacado la consecuencia de que los pollos necesitan aproximadamente 20 veces más eritrocitos que los ratones para poder obtener resultados homologables. Este cálculo se ha llevado a cabo teniendo en cuenta una relación de peso entre ambas especies animales.

En las pruebas combinadas de estudio de interferón y de la actividad sobre la inmuno-respuesta determinada por la presencia de PFC y por la incorporación de la ^3H -timidina, todas las determinaciones fueron efectuadas 96 horas más tarde de la inmunización con SRBC.

En estas condiciones experimentales, las Figs. 52 y 53 muestran un mayor grado de respuesta general en ratones que en pollos, aunque en ambos casos (y dentro de cada especie) no se aprecian diferencias en los niveles de interferón y PFC para tratamientos superiores a los 6 días; es decir, después de que se ha alcanzado un nivel de saturación en la farmacocinética de la tilorona y que lógicamente corresponden a una determinada dosis del fármaco en suero. Dosis, éstas, que no estaba en nuestras posibilidades determinar.

Por otra parte, también se observa que en los 4 primeros días, en ratón, existen mayores niveles relativos de interferón que de respuesta en PFC; mientras que en los días 4 y 5 (periodos que parecen coincidir con el intervalo de maduración de los niveles máximos de respuesta anti-SRBC) se observa un

cierto paralelismo en los patrones de respuesta para ambas especies y una vez más hacemos constar que nuestro aporte en cuanto se refiere al estudio de la actividad de la tilorona en aves es el primero que nos haya sido dado encontrar teniendo en cuenta la bibliografía consultada.

De los experimentos realizados parece confirmarse nuevamente, lo que venimos apuntando de que existen peculiaridades específicas diferenciadoras en la regulación de la respuesta inmune de ambas especies, murina y aviar; y que esta variabilidad se manifiesta en las fases de maduración de las distintas subpoblaciones linfoides, quizá por diferencias en la velocidad de transición de unos estados de maduración a otros de células más específicas.

Cuando este mismo esquema experimental se aplica a estadios tempranos de las células inmunocompetentes midiendo la respuesta proliferativa de los esplenocitos en presencia de lectinas (Figs. 54 y 55), se observa que las intensidades de respuesta en ambos casos es mayor para Con A que para PHA, como ya hemos señalado anteriormente; esta observación que, en principio, responsabilizamos más a diferencias de purificación de la PHA empleada (HOVI y cols., 1978) que al comportamiento intrínseco de las células ha quedado relativamente aclarado en el reciente trabajo de LASSILA y cols. (1979) sobre genética de pollos quienes demuestran que la PHA produce diferentes grados de respuesta que depende de la dotación genética del animal incluso dentro de la misma raza; mientras que la Con A da lugar, siempre, a respuestas de la misma magnitud. Y por otra parte, en todos los casos resultó ser mayor la respuesta relativa "tratados/no tratados" en los primeros 5 días ya que después,

a partir del sexto día, no existen desfases sea cual fuere la especie animal considerada. Ello abona también la hipótesis de que las posibles diferencias en el mecanismo de regulación se produzcan en las fases tempranas antes de llegar al estado maduro y también que estas diferencias se produzcan en los linfocitos B, (puesto que con mitógenos de células T no se apreciaba) o a nivel de los T supresores que es una población pequeña dentro de los timocitos y cuya actividad no se puede medir por este procedimiento. Es nuestro propósito descartar esta posibilidad mediante el ensayo de inhibidores de prostaglandin-sintetasa con lo que si estas diferencias dependen de los T supresores se pondrán más de manifiesto; en el caso de que esto no sucediera quedaría más claro que las diferencias se deben a un distinto mecanismo de regulación en el sistema bursal, lo cual es bastante lógico si se tiene en cuenta las diferencias ontogénicas del sistema inmune en ambas especies animales.

En todo caso la inducción de interferón por tilorona produce una exaltación en la inmunorespuesta que se refleja en el aumento del número de PFC o en la respuesta blástica de los esplenocitos, resultados que coinciden con los de LING y KAY en 1975 y los de GIBSON y cols. en 1976 efectuados sobre ratones.

6. Efecto de un inmunosupresor

Hasta ahora, los efectos inmunosupresores de la ciclofosfamida (CY) han sido preferentemente estudiados sobre modelos inmunológicos de hipersensibilidad retardada pero no hemos encontrado ningún antecedente -excepto nuestras propias experiencias previas (RONDA y cols. 1978)- en las que se ponga también en juego el papel del virus y una respuesta interferón. De aquí nuestro interés por estudiar este problema, máxime cuando parece

comprobado que la presencia de fármacos inmunosupresores puede dar lugar (según las circunstancias experimentales) a efectos paradójicos de immunoestimulación (LAGRANGE y cols. 1974; AS-KENASE y cols. 1975; KATZ y cols. 1979).

Antes de poner en práctica nuestro modelo experimental (Fig. 66) intentamos conocer otras posibles variantes de respuesta que pudieran estar condicionadas por el animal de ensayo, la naturaleza del virus inductor y la modalidad del tratamiento con CY. Así se vé que cuando existen infecciones previas por VSV y NDV, tanto en pollos como en ratones, se observa una depresión de la immunorespuesta primaria anti-SRBC que se manifiesta, en ambos casos, cuando la inoculación del virus ha tenido lugar más de 24 horas antes de la obtención de los esplenocitos; sin embargo, este efecto inmunodepresivo tiende a desaparecer en las infecciones virales de pollos cuando estas se producen a las 12 horas antes de la obtención de dichas células. De este efecto inmunodepresivo, en la bibliografía consultada sobre virus no oncogénicos, no hemos encontrado mención alguna en cuanto se refiere al VSV, mientras que MEDZON y VAS en 1964 estudian la ausencia de actividad de la PHA sobre linfocitos tratados "in vitro" con NDV, apareciendo también una cierta reducción de anticuerpos en esplenocitos de conejo.

En los resultados se aprecia claramente que el sistema inmunitario del ratón es más sensible que el de pollo al efecto depresivo por infección con VSV y NDV (Figs. 56 y 57) y por otra parte, también se observa que el primero de estos virus (VSV) es menos inmunosupresor pese a no estar termoinactivado.

Estas depresiones por virus, generalmente oncogénicos, ya habían sido anteriormente estudiadas, pero su mecanismo

no parece claro en todos los casos dado que las infecciones virales pueden afectar con distinta intensidad y a diferentes niveles las respuestas inmunológicas del huésped. En general, en las infecciones por virus oncogénicos, se puede considerar que los agentes etiológicos actúan crónicamente e intervienen como un factor más en tumorigénesis o en la patogénesis de ciertas autoagresiones.

Cuando sobre estos mismos modelos de inmuno-respuesta anti-SRBC con una infección viral yuxtapuesta de 1 a 5 días, se hace intervenir a la CY en un tratamiento único que precede en 24 horas al antígeno eritrocítico (SRBC) (Figs. 58 y 59), se observan efectos inmunodepresores de menor intensidad aunque análogos en su modalidad; es decir, estos efectos son tanto más intensos cuanto más distanciada está la inoculación del virus de la obtención de los esplenocitos; o lo que es lo mismo, cuanto mayor es el tiempo de acción viral para los intervalos que se consideran, mayor es la inmunosupresión que se produce, aunque siempre sea menor cuando dosis bajas de CY (20 μ g) se asocian a la infección por virus. De este modo se comprueba que, en animales inmunodeprimidos por una dosis de ciclofosfamida, el efecto del virus sobre la respuesta de PFC es menor sin que podamos interpretar por el momento cual es el mecanismo del fenómeno.

Al comprobar este efecto de la CY sobre la acción del virus, en cuanto a la respuesta de PFC, quisimos ampliar aún más el periodo de observación (hasta 8 días antes de la inoculación del antígeno SRBC) y además, por otra parte, conocer el efecto de la CY asociándola al virus con lo que el efecto supresor del fármaco siempre estaba con la misma intensidad relativa

frente al virus y tan sólo variaba la observación en relación con el momento de inoculación del antígeno SRBC (Figs. 60 y 61). Este tipo de experimentos nos permitieron comprobar, no sólo el efecto paradójico de la CY, comparado con la acción inmunosupresora del virus, sino también hacer mucho más patente las diferencias de comportamiento entre ambos virus.

Si se observan las Figs. 56 y 57, en las que el NDV resulta más efectivo como supresor de la inmunorepuesta y se comparan con las Figs. 60 y 61, queda bien demostrado que el NDV es también el más sensible a la acción de la CY, hasta el punto de que 24 horas después de la inyección del antígeno SRBC ya no aparece inmunodepresión alguna cuando se asocia el agente alquilante a la infección viral.

Un efecto semejante a lo observado en pollos se encuentra en los experimentos con ratones, aunque se aprecia más intensamente la inflexión de la curva de la respuesta en presencia de ciclofosfamida a los 4 días antes de la obtención de los esplenocitos y precisamente coincidiendo con la inoculación del antígeno eritrocítico (Figs. 62 y 63). Cuando se hace coincidir el tratamiento ciclofosfámido con la infección viral en ratones, se producen efectos análogos a los observados en pollos aunque las diferencias de comportamiento entre VSV y NDV resultaron ser menos acusadas (Figs. 64 y 65).

Disponiendo de estos datos se diseñó un modelo experimental en el que se usaba una sola dosis de CY a tiempos variables de 1 a 6 días antes de la inmunización anti-SRBC o de la inducción de interferón por NDV o endotoxina y después se medían los efectos supresores en sus momentos de máxima respues-

ta en condiciones normales, es decir en los días +4 y +5 para las UFPH y a las 6 horas para los niveles de interferón (Fig. 66). De este modo se ensaya, efectivamente, la posible acción supresora en ambos sistemas sobre pollos recién nacidos o con 2 meses de edad con el fin de comprobar las variaciones condicionadas por las diferencias del estado de desarrollo del sistema inmunitario.

Así, en relación con el efecto de la CY sobre la respuesta inmunitaria nos encontramos que, en pollos recién nacidos y para las tres dosis de CY en los días 4 y 5 después de la inmunización, es cuando se producen los valores máximos de respuesta inmunitaria (Fig. 67). Comparando los niveles de UFPH que aparecen en condiciones normales con los resultados obtenidos después de los distintos tratamientos, se puede comprobar que con dosis de 100 y 50 mg se produce una inmunosupresión total en todos los casos, mientras que para la dosis de 20 mg se aprecian inhibiciones parciales del 60 al 70% de la inmunorespuesta normal. Esta inmunosupresión se mantiene invariable, sea cual fuere el intervalo de tratamiento con CY, en los 5 días establecidos, antes de la inoculación de los eritrocitos de carnero.

Cuando la experiencia se realiza sobre pollos de 2 meses de edad, de cuyos resultados da idea la Fig. 68, se produce como en el caso anterior, una clara inhibición para dosis de 100 y 50 mg mientras que con la dosis de 20 mg se obtienen los resultados paradójicos y variables que se ven en la figura citada. Efectivamente, aparece una leve inhibición para intervalos de tratamiento entre los días 3 y 5 antes de la inmunización y también un curioso fenómeno de inmunoestimulación cuando estos tratamientos con 20 mg de CY precedieron tan sólo en 24

a 48 horas a la inmunización. Estos resultados, cabría interpretarlos bajo el supuesto de una distinta sensibilidad a los agentes alquilantes de las diferentes subpoblaciones de linfocitos inmunocompetentes (POUPON y cols. 1978) que, para determinadas dosis e intervalos de tratamiento, parecen afectar más a la población de linfocitos T supresores (DEBRE y cols. 1976; DUCLOS y cols. 1977; KOLB y cols. 1977; LAGRANGE y cols. 1974; SCHWARTZ y cols. 1976, VAN PUTTEN y LELIEVELD, 1970). Este hecho pudiera ser semejante al observado por otro grupo de nuestro Instituto con inhibidores de la prostaglandin-sintetasa (BARASOAIN y cols. 1978).

En la Fig. 69 observamos la respuesta de interferón frente a NDV y LPS de B. melitensis y Pl aeruginosa como inductores; se pueden apreciar los niveles normales alcanzados sin CY, que son menores para los LPS y de ellos el más bajo nivel corresponde a LPS de B. melitensis. Cuando estos pollos recién nacidos recibieron los tratamientos con 50 ó 20 mg/kg, se puede ver para la inducción con NDV, que si la dosis con el agente alquilante se administra 5 días antes de la inducción se obtienen resultados análogos a los conseguidos cuando se administra el fármaco 24 horas antes; mientras que para la inducción con LPS se obtienen niveles de interferón ligeramente mayores a los 5 días que a las 24 horas. Estos niveles van disminuyendo del cuarto al segundo día de tratamiento previo y siendo prácticamente iguales los valores obtenidos entre el segundo y tercer día antes de la inducción.

Cuando se consideran los resultados correspondientes a las 24 horas en función de las obtenidos anteriormente, se aprecian niveles de interferón ligeramente superiores para la inducción por NDV, mientras que los niveles obtenidos con induc-

ción por LPS se mantienen en un estado de depresión semejante al observado en los tres días anteriores. Todo ello parece señalar que: i) la naturaleza de la inducción (según sea NDV ó LPS) influye en sus posibilidades de depresión; ii) que en los casos de inducción de interferón por infección viral los linfocitos productores de interferón parecen empezar a recuperarse de la depresión cuando el tratamiento ha sido instaurado 5 días antes; iii) también, en los casos de inducciones por NDV, resulta que tratamientos ciclofosfamidicos, instaurados 24 horas antes no son tan drásticos como los de 48 horas antes de la inducción. Este intervalo parece ser el óptimo para condicionar una depresión de interferón por CY; iv) no existen diferencias representativas entre los valores obtenidos para ambas dosis de CY en cuanto a su efecto depresor del interferón y v) la inducción por LPS resultó ser más sensible y duradera a la depresión con CY. Quizá esto se origine por desequilibrio en los procesos de regulación del sistema inmunitario, dado que el inductor empleado, en estos casos, es a su vez mitógeno específico para linfocitos B, que también a su vez resultan ser los mas afectados por el fármaco inmunosupresor.

Cuando este mismo protocolo experimental se aplica a pollos de 2 meses de edad (Fig. 70) se puede ver que no existe diferencia alguna en función de las dosis de CY y también que la inducción de interferón en animales de esa edad no resulta afectada por el tratamiento ciclofosfamidico para los intervalos establecidos entre 1 y 5 días. Esta diferencia de comportamiento con lo observado para pollos recién nacidos nos hace pensar que los niveles de interferón encontrados corresponden a los producidos por otras células distintas de las linfocitarias.

7. Variaciones en función de las características del sistema inmunitario del huésped

Como se puede ver, a lo largo de la exposición de resultados, hemos ido estableciendo experimentos comparativos entre pollos y ratones para los distintos modelos biológicos usados en nuestro protocolo experimental. De aquí que en este momento podamos considerar las posibles diferencias observadas en cada caso.

En efecto, en cuanto a la inducción de interferón cabe admitir que en ambos sistemas aviar y murino son semejantes las respuestas independientemente del inductor que se considere: virus, endotoxina o tilorona; aunque pueden aparecer diferencias de intensidad en el nivel de la respuesta y que ésta siempre aparece mayor en ratón que en pollo, correspondiendo la máxima diferencia a la inducción con tilorona y la mínima a la inducción con endotoxinas.

Valorando comparativamente esta respuesta cuando existe una virus-sensibilización previa hemos encontrado títulos de interferón muy semejantes en esplenocitos de pollos y ratones y también, en ambas especies se observaron otras analogías de comportamiento representadas por los incrementos en el título de interferón cuando media una virus-sensibilización sobre todo cuando se efectúa la estimulación desencadenante con virus inactivados. Tanto en uno como en otro tipo de especie se utilizaron también pruebas testigo de estimulación linfoblástica mediante lectinas y los resultados sirvieron análogamente como buenos patrones de actividad celular en la incorporación de ^3H -timidina. Sin embargo la comparación entre ambos tipos de esplenocitos aviares y murinos no se pudo llevar

hasta el punto de estudiar las relaciones de parentesco entre los distintos virus por la ausencia de multiplicación de los mixovirus en células murinas.

Cuando se estudian las interacciones entre interferón e inmunorespuesta se observa, tanto en pollos como en ratones, un efecto inmunodepresor variable producido por el interferón sobre las células del huésped que -aunque depende del tiempo de contacto, naturaleza del inductor y dosis empleada- siempre aparecen más resistentes a la acción del interferón los esplenocitos de pollo que los murinos. Por otra parte, si comparamos los comportamientos celulares obtenidos por experimentos "in vitro" a través de las variaciones de estimulación policlonal vemos que las respuestas mitogénicas son claramente más bajas en pollos que en ratones, aunque la inhibición relativa de la respuesta fuera semejante en ambos casos tanto en intensidad como en modalidad según el tipo de inductor empleado. Todo ello puede ser debido no sólo a particularidades en la complejidad del sistema inmunitario sino también a diferencias en los mecanismos de regulación en ambos modelos animales; recientes estudios sobre variaciones en el comportamiento de la actividad antiviral del interferón (SCHELLEKENS y cols. 1979) dependiendo del huésped podrían explicar, a su vez, las diferencias de grado en la inmunorespuesta.

La inducción de interferón mediante tilorona también constituyó un excelente modelo biológico para comparar patrones de comportamiento; en este tipo de ensayos siempre la respuesta en la especie murina fue claramente superior a la aviar, sobre todo en cuanto se refiere al empleo de dosis repetidas aunque los patrones de comportamiento sean semejantes tanto en la inducción de interferón como en las relaciones de éste con la respuesta inmunitaria del huésped.

Para este tipo de ensayos se comprobó que los pollos precisaban una dosis inmunizante superior (en una unidad logaritmica) que los ratones para conseguir respuestas homologables entre ambas especies. Como diferencias particulares a destacar se aprecia que, en ratón, aparecen mayores niveles relativos de interferón que de respuesta en PFC en los 4 primeros días subsiguientes a la inmunización, aunque desde el punto de vista general se puede afirmar que la tilorona produce una exaltación en la inmunorespuesta tanto en pollos como en ratones; hecho que, en estos últimos, ya había sido señalado también por LING y KAY (1975) y por GIBSON y cols. (1976).

Finalmente, sobre modelos biológicos inmunosuprimidos, se aprecia que el sistema inmunitario murino es más sensible que el aviar a depresiones por virus y cuando se hace intervenir a la ciclofosfamida se producen efectos inmunodepresores de menor intensidad e incluso una paradójica inmunoestimulación dependiendo de la dosis del agente alquilante y el intervalo que media entre la administración y el momento de la inmunización anti-SRBC. Este tipo de efectos se observa tanto en pollos como en ratones, aunque en éstos últimos se aprecia una inflexión más acusada en la curva de respuesta ciclofosfámica (Figs. 62 y 63). Todo ello nos lleva a pensar que el mecanismo de síntesis de interferón es análogo en pollos y ratones, apreciándose efectos biológicos de variable intensidad que dependen de otras particularidades de la relación virus-huésped, y por otra parte, se aprecian algunas diferencias más específicas de comportamiento que parecen depender de algunas peculiaridades de los mecanismos de regulación, sobre todo si se consideran las interacciones entre interferón y respuesta inmunitaria del huésped en las que no sólo intervienen diferencias en la organización del sistema

immune sino también en posibles factores inmunomoduladores de las respuestas. Consideramos que estas diferencias deben producirse en las fases mas tempranas de la inmunorespuesta, aunque este supuesto requiere una confirmación más definitiva.

VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Así, después de realizar una amplia investigación bibliográfica en la que se resumen los conocimientos actuales relativos a los Mixovirus como antígenos y agentes inductores de interferón y otros muchos datos referentes a las propiedades químicas y biológicas del interferón se ha planteado un protocolo experimental que nos permitiera aportar nuevos datos al conocimiento de la problemática de inducción del interferón en aves así como los efectos de esta glicoproteína sobre la respuesta inmune del huésped. También por otra parte se han obtenido resultados, en experimentos paralelos sobre ratones, con el fin de tener información sobre las posibles diferencias de comportamiento frente a una infección viral condicionadas por diferencias entre el sistema inmunitario del huésped y consecuentemente sobre los mecanismos reguladores de ambas respuestas, tanto de la producción de interferón como de la inmunitaria.

Y después de analizar y considerar los diferentes resultados obtenidos cabe establecer las siguientes conclusiones:

- 1.- Estudiada la viabilidad y supervivencia de fibroblastos de pollo se distinguen tres fases en la curva de crecimiento y se fija como periodo idóneo el de 24 - 48 horas después de su preparación por su menor dispersión de resultados y por no apreciarse aún degeneración del cultivo celular.
- 2.- Ensayos de viabilidad y supervivencia de células de línea, L 929, de ratón mostraron su mejor capacidad para la producción de interferón, en nuestras condiciones experimentales, a los tres días de cultivo.
- 3.- Estudiada la vitalidad de 64 lotes de membrana corialantoidea se comprobó que el periodo de 12 a 36 horas después de su puesta en medio nutritivo adecuado es el idóneo para determinar el grado de una infección viral por mixovirus medido por su poder hemaglutinante.
- 4.- Determinada la actividad biológica de FPV e influenza (orthomixovirus) y NDV y Sendai (paramixovirus) sobre fibroblastos de embrión de pollo se encontraron como dosis infectivas óptimas 6×10^3 a 1×10^4 DICT, sin que apareciera diferencia alguna en el grado de infectividad entre ambos grupos de virus.
- 5.- Se estudia la termosensibilidad viral (a 37°C y valores de pH 6 y 7,2) mediante ensayos de poder citopático y hemaglutinante sobre medio desprovisto de células, encontrándose que los cuatro mixovirus ensayados pierden su poder infectivo a las 48 horas mientras que su poder hemaglutinante sufre un descenso en las primeras 24 horas y se mantiene invariable después.

- 6.- La inducción de interferón "in vivo" sobre pollos, efectuada con VSV y NDV dió lugar a niveles en suero de 90 y 1.800 U respectivamente.
- 7.- Cuando la inducción "in vivo" en pollos se efectúa con endotoxinas se observaron niveles de interferón algo más bajos que los conseguidos con NDV y siempre proporcionales a la dosis de LPS utilizada.
- 8.- Por primera vez se ha estudiado sobre pollo la inducción de interferón por tilorona. Tratamientos orales (0,3 mg/10 gr peso vivo) de tilorona dieron niveles muy altos de interferón (3.200 U).
- 9.- Inducción "in vitro" sobre fibroblastos de pollo con NDV y endotoxinas de Pseudomonas y Brucella dieron resultados de 1.200, 760 y 680 U respectivamente.
- 10.- Cuando la inducción "in vitro" se efectúa sobre esplenocitos de pollo con los tres inductores anteriormente citados encontramos títulos de interferón aviar de 500, 320 y 240 U respectivamente.
- 11.- La inducción "in vitro" sobre esplenocitos de pollos previamente sensibilizados "in vivo" con NDV ó FPV dieron lugar a incrementos en los títulos de interferón que en ocasiones alcanzan a un 300% especialmente cuando la inducción se efectuaba con el virus homólogo.
- 12.- Cuando esta inducción "in vitro" previa sensibilización de los animales donadores de los esplenocitos se realiza de una manera cruzada se pueden obtener datos sobre el parente-

co bioquímico y biológico entre los virus sensibilizantes y los inductores.

- 13.- En las pruebas de neutralización cruzada entre NDV y FPV se comprobó, una vez más, el parentesco antigénico aunque conservando cada virus una gran especificidad inmunobiológica ya que tratamientos homólogos de tres semanas de sensibilización eran capaces de inhibir totalmente la infectividad del virus inoculado.
- 14.- Asimismo y con propósitos comparativos se han realizado ensayos de inducción de interferón en ratón con NDV, endotoxinas y tilorona y se ha comprobado un comportamiento análogo al observado en pollos ya que los máximos niveles se obtenían con tilorona y los menores con endotoxinas de Brucella, aunque en todos los casos aparecían niveles superiores a los aviares.
- 15.- También cuando sobre esplenocitos de ratón realizamos experiencias de inducción de interferón, previa sensibilización del animal observamos análogo comportamiento que en pollo aunque alcanzando niveles algo superiores.
- 16.- En estudios "in vivo" relativos a la acción del interferón sobre la respuesta inmune anti-SRBC en pollos se utilizó la blastogénesis para ver los efectos sobre las fases tempranas proliferativas apreciando una clara actividad inmunosupresora que es proporcional a la dosis de interferón y dependiente de la lectina utilizada.
- 17.- En estas experiencias de transformación blástica en presencia de interferón se comprobó que el grado de inmunodepresión varía en función de la naturaleza y dosis del interferón, así como del intervalo previo a la inmunización.

- 18.- Cuando estudiamos este efecto "in vivo" a nivel de expresión final de la inmunorespuesta mediante determinación de células formadoras de IgM encontramos un efecto inmunosupresor en todos los casos pero con un nivel acusadamente superior en presencia de interferón NDV -inducido en relación con los endotoxin-inducidos. Asimismo en todos los casos se observa que este efecto supresor está condicionado a la dosis de interferón y al periodo de acción en relación con el momento de la eritroinmunización.
- 19.- En todos los casos en que se emplearon esplenocitos aviares fue preciso utilizar, para estas pruebas de determinación de PFC, mezclas de complemento de pollo y cobaya a proporción de 1 a 4 (v/v) para obtener las máximas respuestas de caracter invariable.
- 20.- El óptimo de depresión de inmunorespuesta por la inoculación de interferón en pollos se consiguió con 2.500 U/10 gr de peso vivo y entre los días 14 y 16 antes de la inmunización anti-SRBC, sea cual fuere la naturaleza del interferón.
- 21.- Este efecto "in vivo" se produce igualmente en ratón, excepto en que aparecen los máximos de depresión entre los 11 y 12 días previos a la inmunización cuando se trata de interferón endotoxin-inducido y que este efecto depresor empieza a disminuir a los 15 - 16 días antes de la inmunización.
- 22.- También se plantearon experimentos "in vitro" para conocer el efecto del interferón sobre la respuesta inmune de pollos y se comprueba sobre las células formadoras de IgM que tan sólo se obtienen efectos de tipo depresor con dosis de 2.500 U/ml y que la intensidad de este efecto es variable según la

naturaleza del interferón y del tiempo de contacto "in vitro", obteniéndose las máximas depresiones después de 7 horas de contacto de esplenocitos e interferón.

- 23.- Los efectos "in vitro" del interferón sobre la capacidad de transformación linfoblástica de los esplenocitos de pollo demostraron que esta acción depresora se produce también en las fases iniciales de proliferación linfoide, siendo máxima esta depresión a partir de las 8 horas de contacto e independientemente del mitógeno que se utilice; asimismo se observan algunas diferencias en la intensidad del fenómeno dependientes de la naturaleza del interferón.
- 24.- También sobre ratón se han estudiado, comparativamente, "in vivo" e "in vitro" las relaciones entre interferón y respuesta inmune observando comportamientos análogos aunque encontrando que la depresión, tanto "in vivo" como "in vitro" era mucho más intensa que en pollo. Por otra parte existen mayores diferencias entre respuesta frente a Con A y PHA en pollo que en ratón.
- 25.- Estudiada la inducción de interferón con tilorona en pollos en administración durante 10 días antes de la inmunización con SRBC, y su influencia en la inmunorespuesta "in vivo" comprobamos, después de fijar las condiciones óptimas de tratamiento, que el máximo de interferón apareció a partir de la cuarta dosis de la droga mientras que el máximo de respuesta inmune aparece a partir de la sexta dosis.
- 26.- Cuando este efecto de la tilorona se mide en función de la incorporación de ^3H -timidina en esplenocitos de pollo se comprueba que el máximo de respuesta aparece también al cabo

de los 6 días de tratamiento tanto en las células estimuladas con mitógenos (Con A y PHA) como en los testigos sin lectinas.

- 27.- Al comparar el efecto de la tilorona en experimentos con ratones nos encontramos, al igual que en pollos, una innoestimulación cuyo máximo nivel aparece tanto sobre PFC como sobre transformación linfoblástica al cabo de los 6 días de tratamiento.
- 28.- Con nuestros experimentos parece suficientemente claro que la administración de interferón exógeno inducido por métodos clásicos produce una inmunodepresión mientras que la administración directa del inductor sintético (tilorona) además de originar altos niveles de interferón es capaz de producir una potenciación en la inmunorespuesta, que varía en intensidad según el momento de administración del inductor y del antígeno SRBC.
- 29.- La producción de interferón con NDV o endotoxinas en pollos tratados con ciclofosfamida reveló claramente la influencia de la edad del animal, ya que en pollos de 2 meses de edad no se observó efecto alguno sobre los niveles de interferón cualquiera que fuese el inductor, mientras que en pollos recién nacidos se observan grados variables de inhibición en la síntesis de interferón que dependen de la dosis de ciclofosfamida (20 ó 50 mg/kg de peso vivo), del inductor (NDV o LPS) y del momento en que se administró el agente alquilante antes de la inducción. La mayor inhibición en cualquier caso, apareció inoculando la ciclofosfamida entre los días 2 y 3 antes de la inducción.

- 30.- Estudiada la inmunorespuesta en pollos sobre un sistema inmuno-defectivo por la presencia de la ciclofosfamida se comprueba la influencia de la edad del animal, o lo que es lo mismo del estado de desarrollo de su sistema inmunitario, hasta el punto de que dosis de ciclofosfamida superiores a 20 mg/kg peso vivo producen una anulación total de la inmunorespuesta en pollos recién nacidos y con dosis de 20 mg se producen inmunosupresiones aproximadamente del 75%. Estos mismos ensayos en pollos de dos meses de edad, para estas mismas dosis de 20 mg, muestran casi una completa indiferencia con tratamientos únicos entre los 3 y 5 días antes de la inmunización eritrocítica, mientras que aparece una clara inmunoestimulación cuando se administra 1 ó 2 días antes.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, W.R. y PRINCE, A.M. (1957) Immunohistochemic studies on the interaction between Ehrlich ascites in tumor cells and Newcastle Disease Virus. *J. Exp. Med.* 106, 617
- ADAMSON, R.H. (1971 a) The antitumor activity of tilorone hydrochloride. *J. Nat. Cancer Inst.* 46, 431
- ADAMSON, R.H. (1971 b) Antitumor activity of two antiviral drugs rifampicin and tilorone. *Lancet* 1, 398
- AISENBERG, A.C. (1967) Studies on cyclophosphamide induced tolerance to sheep erythrocytes. *J. Exp. Med.* 125, 833
- ALBRECHT, W.L., FLEMING, R.W., HORGAN, S.W., DECK, B.A., HOFFMAN J.W. y MAYER, G.D. (1974) Bis-basic-substituted polycyclic aromatic compounds. A new class of antiviral agents. 1, 2, 6 Bis-basic-substituted fluoranthenes. *J. Med. Chem.* 17, 1150
- ANDREWES, C.H., BANG, F.B. y BURNET, F.M. (1955) A short description of the myxovirus group (influenza and related viruses) *Virology* 1, 176
- ANDREWS, R.D. (1961) Specificity of interferon. *Brit. Med. J.* 1, 1728
- ANKLE, H., CHANY, C., GALLIOT, B., CHEVALIER, M.J. y ROBERT, M. (1973) Antiviral effect of interferon covalently bound to sepharose. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 70, 2360
- ASHERSON, G.L. y ZEMBALA, M. (1978) Recognition of different types of T suppressor cells, which affect cell mediated immunity, on the basis of the cyclophosphamide and adult thymectomy. En: *The pharmacology of immunoregulation* (Ed. WERNER, G.H. y FLOC'H, F. Academic Press. London-New York-San Francisco p. 141

- ASKENASE, P.W., HAYDEN, B.J. y GERSHON, R.K. (1975) Augmentation of delayed type hypersensitivity by doses of cyclophosphamide which do not affect antibody response. *J. Exp. Med.* 141, 697
- BACHI, T., AGUET, M. y HOWE, C. (1973) Fusion of erythrocytes by Sendai virus studied by immuno-freeze-etching. *J. Virol.* 11, 1004
- BARASOAIN, I. (1976) Estudio inmunobiológico de endotoxinas bacterianas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Complutense. Madrid
- BARASOAIN, I., ROJO, J.M. y PORTOLES, A. (1977) La supresión de la respuesta inmune y sus significados biológicos. En: Aspectos actuales de la relación huésped-parásito e intermicrobianas. Monografías básicas de la S.E.M. 2, Ed. PORTOLES A. y BAQUERO, F. pag. 75
- BARASOAIN, I., ALONSO, M.L., ROJO, J.M., RONDA, E. y PORTOLES, A. (1978) Comparative study of immunobiological activities of *Pseudomonas aeruginosa* y *Brucella melitensis* lipopolysaccharides. *Current Microbiol.* 1, 263
- BARASOAIN, I., ROJO, J.M., SUNKEL, C. y PORTOLES, A. (1978) Indomethacin esters acting as antiinflammatory and immunosuppressive drugs. *Int. J. Clin. Pharmacol.* 16, 235
- BARON, S. y BUCKLER, C.E. (1963) Circulating interferon in mice after intravenous injection of virus. *Science (Washington)* 141, 1061
- BARON, S., MERIGAN, T.C. y MCKERLIE, M.L. (1966) Effect of crude and purified interferons on the growth of uninfected cells in culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* 121, 50
- BARTH, R.F. y SINGLA, O. (1973) Differential effects of Concanavalin A on T helper dependent and independent antibody responses. *Cell. Immunol.* 9, 96
- BENDINELLI, M. y FRIEDMAN, H. (1976) Immunodepression by Rowson-Parr virus in mice: lymphocyte markers and capping response of spleen and lymph node cells after infection. *Infect. Immunity* 14, 613
- BENDINELLI, M., MATTEUCCI, D., TONIOLO, A. y FRIEDMAN, H. (1979) Suppression of in vitro antibody response by spleen cells of mice infected with Friend-associated lymphatic leukemia virus. *Infect. Immunity* 24, 1

- BERENBAUM, M.D. (1969) Immunosuppressive Agents: The design of selective therapeutic schedules. En: The immune response and its suppression. Ed. OSRKIN, E. y DE WECK, A.S. Karger Ag. Basel. (Suiza)
- BERG, K., OGBURN, C.A., PAUCKER, K., MOGENSEN, K.E. y CANTELL, K. (1975) Affinity chromatography of human leukocyte and diploid cell interferons on sepharose bound antibodies. *J. Immunol.* 114, 640
- BERNOVSKA, J., KOSTKA, J. y STERZL, J. (1963) Hemolytic reaction in gels. *Folia Microbiol.* 8, 376
- BEVAN, M.J., PARKHAUSE, R.M.E., WILLIAMSON, A.R. y ASKONAS, B.A. (1972) Biosynthesis of immunoglobulins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 25, 131
- BILLIAU, A., JONIAU, M., DE SOMER, P. (1973) Mass production of human interferon in diploid cells stimulated by poly I:C. *J. gen. Virol.* 19, 1
- BLOOM, B.R. (1971) In vitro approaches to the mechanism of cell-mediated immune reactions. *Adv. Immunol.* 13, 101
- BLOOM, B.R. y GLADE, P.R. eds. (1971) In vitro methods of cell mediated immunity. Academic Press. New York.
- BOOTH, R.J., RASTRICK, J.M., BELLAMY, A.R. y MARBROOK, J. (1976 a) Modulating effects of interferon preparations on an antibody response in vitro. *J. Austral. Exp. Biol. Med.* 54, 11
- BOOTH, R.J., BOOTH, J.M. y MARBROOK, J. (1976 b) Immune conservation: A possible consequence of the mechanism of interferon induced antibody suppression. *Eur. J. Immunol.* 6, 769
- BOURNE, H.R., LICHTENSTEIN, L.M., MELMON, K.L., HENNEY, C.A., WEINSTEIN, Y. y SHEARER, G.M. (1974) Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. *Science* 184, 19
- BRATT, M.A. y GALLAGHER, W.R. (1969) Preliminary analysis of the requirements for fusion from within and fusion from without by Newcastle Disease Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64, 536
- BRATT, M.A. y CLAVELL, L.A. (1972) Hemolytic interaction of Newcastle Disease Virus and chicken erythrocytes. *Appl. Microbiol.* 23, 454

- BRAUN, W. y LEVY, H.B. (1972) Interferon preparations as modifiers of immune responses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 141, 769
- BREITENFELD, P.M. y SCHAFER, W. (1957) The formation of Fowl Plague Virus antigens in infected cells, as studied with fluorescent antibodies. *Virology* 4, 328
- BRODEUR, B.R. y MERIGAN, T.C. (1974) Suppressive effect of interferon on the humoral immune response to sheep red blood cells in mice. *J. Immunol.* 113, 1319
- BRODEUR, B.R. y MERIGAN, T.C. (1975) Mechanism of the suppressive effect of interferon on antibody synthesis in vivo. *J. Immunol.* 114, 1323
- BRODEUR, B.R., WEINSTEIN, Y., MELMON, K.L. y MERIGAN, T.C. (1977) Reciprocal changes in interferon production and immune responses of mouse spleen cells fractionated over columns of insolubilized conjugates of histamine. *Cell. Immunol.* 29, 363
- BROUTY-BOYE, D. y TOVEY, M.G. (1978) Inhibition by interferon of thymidine uptake in chemostatic cultures of L 1210 cells. *Intervirology* 9, 243
- BUCK, K.W., CHAIN, E.B. y HIMMELWEIT, F. (1971) Comparison of interferon induction in mice by purified penicillium chrysogenum virus and derived double stranded RNA. *J. gen. Virol.* 12, 131
- BUCHAN, A. y BURKE, D.C. (1966) Interferon production in chick embryo cells. The effect of puromycin and p-fluorophenylalanine. *Biochem. J.* 99, 530
- BUCHER, D.J. y KILBOURNE, E.D. (1972) A₂ (N2) neuraminidase of the X - 7 influenza virus recombinant: determination of molecular size and subunit composition of the active unit. *J. Virol.* 10, 60
- BUCKNALL, R.A. y CARTER, S.B. (1967) A reversible inhibitor of nucleic acid synthesis. *Nature (London)* 213, 1099
- BURKE, D.C. e ISAACS, A. (1958 a) Further studies on interferon. *Brit. J. Exp. Pathol.* 39, 78
- BURKE, D.C. e ISAACS, A. (1958 b) Some factors affecting the production of interferon. *Brit. J. Exp. Pathol.* 39, 452

- CANTELL, K. y PYHALA, L. (1973) Circulating interferon in rabbits after administration of human interferon by different routes. *J. gen. Virol.* 20, 97
- CANTELL, K. PYHALA, L. y STRANDER, H. (1974 a) Circulating human interferon after intramuscular injection into animals and man. *J. gen. Virol.* 22, 453
- CANTELL, K., HIRVONEN, S., MOGENSEN, K.E., y PYHALA, L. (1974 b) Human leucocyte interferon: production, purification, stability and animal experiments. En: The production and use of interferon for the treatment and prevention of human virus infections proceedings of a tissue culture association workshop. In vitro: monographs n°3. Tissue Culture Association WAYMOUTH. Ed. pag. 35
- CAVALIERI, R.L., HAVELL, E.A., VILCEK, J. y PESTKA, S. (1977) Induction and decay of human fibroblast interferon mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 74, 4415
- CEGLOWSKI, W.S. (1971) Leukemia virus suppression of antibody-forming cells: ultrastructure of infected spleens. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 181, 272
- CEGLOWSKI, W.S., FRIEDMAN, H. (1968 a) Immunosuppression by leukemic viruses. I. Effect of Friend disease virus on cellular and humoral hemolysin responses of mice to a primary immunization with sheep erythrocytes. *J. Immunol.* 101, 594
- CEGLOWSKI, W.S., FRIEDMAN, H. (1968 b) Immunosuppressive effects of Friend and Rauscher leukemic disease virus on cellular and humoral antibody formation. *J. Nat. Cancer Inst.* 40, 98
- CEGLOWSKI, W.S., CAMPBELL, B.P. y FRIEDMAN, H. (1975) Immunosuppression by leukemic viruses. XI. Effect of Friend Leukemic virus on humoral immune competence of leukemic resistant C57BL/6 mice. *J. Immunol.* 114, 231
- CEROTTINI, J.C., BRUNNER, K.T., LINDAHL, P. y GRESSER, I. (1973) Inhibitory effect of interferon preparations and inducers on the multiplication of transplanted allogeneic spleen cells and syngeneic bone marrow cells. *Nature (New Biol)* 242, 152
- CLAVELL, L.A. y BRATT, M.A. (1972) Hemolytic interaction of Newcastle Disease virus and chicken erythrocytes. II. Determining factors. *Appl. Microbiol.* 23, 461

- COMPANS, R.W. (1973) Influenza virus proteins. II. Association with components of the cytoplasm. *Virology* 51, 56
- COMPANS, R.W., HOLMES, K.V., DALES, S. y CHOPPIN, P.W. (1966) An electron microscopic study of moderate and virulent virus-cell interactions of the parainfluenza virus SV5. *Virology* 30, 411
- COMPANS, R.W. y DIMMOCK, N.J. (1969) An electron microscopic study of single-cycle infection of chick embryo fibroblasts by influenza virus. *Virology* 39, 499
- COMPANS, R.W., KLENK, H.D., CALIGUIRI, L.A., CHOPPIN, P.W. (1970) Influenza virus proteins. I. Analysis of polypeptides of the virion and identification of spike glycoproteins. *Virology* 42, 880
- COMPANS, R.W. y CHOPPIN, P.W. (1971) The structure and assembly of influenza and parainfluenza viruses. En: Comparative Virology MARAMOROSCH, K. y KURSTAK, F. eds. Academic Press. New York. 407
- COOPER, M.D., PERRY, D.Y., MCKNEALLY, M.F., GABRIELSON, A.E., SUTHERLAND, D.E. y GOOD, R.A. (1966) A mammalian equivalent of the avian bursa of Fabricius. *Lancet* I, 1388
- COOPER, M.D., KINCADE, P.W., BOCKMAN, D.E. y LAWTON, A.R. (1974) The development of the immune system. En: The Immunoglobulin A System, Plenum Press. N.Y. pag. 13
- CREAGAN, R.P., TAN, Y.H. y RUDDLE, F.H. (1975) Somatic cell genetic analysis of the interferon system. *Federation Proceedings* 34, 2222
- CHANG, E.H. MYERS, M.W. y FRIEDMAN, R.M. (1977) The effect of interferon on the novo infection of Moloney murine Leukemic virus. *Cell* 10, 245
- CHANY, C. (1976) Membrane-bound interferon specific cell receptor system: role in the establishment and amplification of the antiviral state. *Biomedicine* 25, 148
- CHANY, C., ANKEL, H. y BOURGEADE, M.F. (1975) Antiviral mechanisms. Perspectives in Virology IX. Ed. Pollard, A. Academic Press, London, New York, 269
- CHEN, C., COMPANS, R.W. y CHOPPIN, P.W. (1971) Parainfluenza virus surface projections: glycoproteins with hemagglutinin and neuraminidase activities. *J. gen. Virol.* 11, 53

- CHESTER, T.J., PAUCKER, K. y MERIGAN, T.C. (1973) Suppression of mouse antibody producing spleen cells by various interferon preparations. *Nature (London)* 246, 92
- CHOPPIN, P.W., KLENK, H.D., COMPANS, R.W. y CALIGUIRI, L.A. (1971) From molecules to man. Vol. VII: Perspectives in Virology POLLARD, M. ed. 127. Academic Press. New York
- DAJANI, B.M., KASIK, J.E. y THOMSON, J.S. (1973) Effect of rifampicin on the immune response in guinea pig. *Antimicrobial Ag. Chemoth.* 3, 451
- DAVEY, N.W., SULKOWSKI, E. y CARTER, W.A. (1976 a) Hydrophobic interaction of human, mouse and rabbit interferons with immobilised hydrocarbons. *J. Biol. Chem.* 251, 7620
- DAVEY, M.W., SULKOWSKI, E. y CARTER, W.A. (1976 b) Purification and characterisation of mouse interferon with novel affinity sorbents. *J. Virol.* 17, 439
- DAVID, J.R. (1971) Mediators produced by sensitized lymphocytes. *Fed. Proc.* 30, 1730
- DAVID, J.R. (1972) Characterization of migration inhibitory factor (MIF) from guinea pig lymphocytes stimulated with Concanavalin A. *Progr. Allergy* 16, 300
- DEBRE, P., WALTENBAUGH, C., DORF, M. y BENACERRAF, B. (1976) Genetic control of specific immune suppression. III. Mapping of H-2 complex complementing genes controlling immune suppression by the random copolymer L-glutamic acid-L-tyrosine induced in BALB/C mice by cyclophosphamide. *J. Exp. Med.* 144, 272
- DE CLERCQ, F. y MERIGAN, T.C. (1971) Bis-DEAE-fluorenone: Mechanism of antiviral protection and stimulation of interferon production in the mouse. *J. Infect. Dis.* 123, 190
- DE CLERCQ, E., EDY, V.G. y CASSIMAN, J.J. (1975) Nonantiviral activities of interferon are not controlled by chromosome 21. *Nature* 256, 132
- DEGRE, M. y HOVIG, T. (1976) Human interferon and cell growth inhibition. I. Inhibitory effect of human interferon on the growth rate of cultured human cells. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B* 84, 347
- DE MAEYER, E. y DE MAEYER, J. (1963) Two-sided effect of steroids on interferon in tissue culture. *Nature (London)* 197, 724

- DE MAEYER, E., DE MAEYER-GUIGNARD, J. y JULLIEN, P. (1969)
Interferon synthesis in X-irradiated animals. III. The
high radiosensitivity of mixovirus-induced circulating
interferon production. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 131,
36
- DE MAEYER, E., DE MAEYER-GUIGNARD, J. y VANDEPUTTE, M. (1975)
Inhibition by interferon of delayed-hypersensitivity in
the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 72, 1753
- DENNIS, A.J., WILSON, H.E., BARKER, A.D. y RHEINS, M.S. (1972)
Interferon induction in normal and leukemia human lympho-
cyte cultures by tilorone hydrochloride. *Proc. Soc. Exp.*
Biol. Med. 141, 782
- DE SOMER, P., DE CLERCQ, E., COCITO, C. y BILLIAU, A. (1969)
(1969, June, New York, 2nd Conference on Antiviral Substan-
ces). The interferon inducer from burcella. *Ann. N.Y.*
Acad. Sci (1970) 173, 274
- DIAMANSTEIN, T. (1973) Stimulation of humoral immune response
by tilorone hydrochloride. *Immunology* 24, 771
- DORNER, F., SCRIBA, M. y WEIL, R. (1973) Interferon: Evidence
for its glycoprotein nature. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 70
1981
- DRZENIEK, R., FRANK, H. y ROTT, R. (1968) Electron microscopy
of purified influenza virus neuraminidase. *Virology* 36, 703
- DUCLOS, H., GALANAUD, P., DEVINSKY, O., MAILLOT, M. C. y DORMONT,
J. (1977) Enhancing effect of low dose cyclophosphamide
treatment on the in vitro antibody response. *Eur. J. Immu-
nol.* 7, 679
- DULBECCO, R. (1952) Production of plaques in monolayer tissue
cultures by single particles of an animal virus. *Proc. Natl.*
Acad. Sci 38, 747
- DULBECCO, R. y VOGT, M. (1954 a) Plaque formation and isolation
of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* 99,
167
- DULBECCO, R. y VOGT, M. (1954 b) One-step growth curve of wes-
tern equine encephalomyelitis virus on chicken embryo cells
grown invitro and analysis of virus yields from single cell
J. Exp. Med. 99, 183

- DUMONDE, D.C., WOLSTENCROFT, R.A., PANASY, G.S., MATTHEW, M. MORLEY, J. y HOWSON, W.T. (1969) Lymphoquines: non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. *Nature* (London) 224, 38
- DUTTON, R.W. (1972) Inhibitory and stimulatory effects of Concanavalin A on the response of mouse spleen cell suspensions to antigen. I. Characterization of the inhibitory cell activity. *J. Exp. Med.* 136, 1445
- DUTTON, R.W., FALCOFF, R., HIRST, J.A., HOFFMANN, M., KAPPLER, J.W., KETTMAN, J.R., LESLEY, J.F. y VAUN, D. (1971) En: *Progress in Immunology* 355. AMOS, B. Ed. Academic Press New York
- EAGLE, H. (1959) Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130, 432
- EGAN, H.S., REEDER, W.J. y EKSTEDT, R.D. (1974) Effect of concanavalin A in vivo in suppressing the antibody response in mice. *J. Immunol.* 112, 63
- EINHORN, S. y STRANDER, H. (1977) Is interferon tissue specific? Effect of human leucocyte and fibroblast interferons on the growth of lymphoblastoid and osteosarcoma cell lines. *J. gen. Virol.* 35, 573
- EMODY, L., RALOVICH, B., BARNA, K., BRASCH, G. y TERNAK, G. (1971) Physiological effect of orally administered endotoxin to people. *Tomado de Chem. Abstract* 82, 102
- EPSTEIN, L.B. y MERIGAN, T.C. (1968) Comunicación personal a REGELSON en: Will interferon be clinically useful? Discussion. En: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1970) 173, 637
- EPSTEIN, L.B., CLINE, M.J. y MERIGAN, T.C. (1970) Macrophage-lymphocyte interaction in the PHA stimulated production of interferon in vitro. In: *Proc. 5th leucocyte culture conference*. Ed. HARRIS, J.E. Academic Press London, New York. 501
- EPSTEIN, L.B., CLINE, M.J. y MERIGAN, T.C. (1971 a) PPD stimulated interferon: in vitro macrophage-lymphocyte interaction in the production of a mediator of cellular immunity. *Cell Immunol.* 2, 602

- EPSTEIN, L.B., CLINE, M.J. y MERIGAN, T.C. (1971 b) The interactions of human macrophages and lymphocytes in the PHA stimulated production of interferon. *J. Clin. Invest.* 50, 744
- EPSTEIN, L.B., STEVENS, D.A. y MERIGAN, T.C. (1972) Selective increase in lymphocyte interferon response to vaccinia antigen following revaccination. *Proc. Nat. Acad. Sci* 69, 2632
- EPSTEIN, L.B. y AMMANN, A.J. (1974) Evaluation of T lymphocyte effector function in immunodeficiency diseases: abnormality in mitogen stimulated interferon in patients with selective IgA deficiency. *J. Immunol.* 112, 617
- EPSTEIN, L.B., KRETH, H.W. y HERZENBERG, L.A. (1974) Fluorescence-activated cell sorting of human T and B lymphocytes. II: Identification of the cell type responsible for interferon production and cell proliferation in response to mitogens. *Cell. Immunol.* 12, 407
- EPSTEIN, L.B. y EPSTEIN, C.J. (1976) Localization of the gene AVG for the antiviral expression of immune and classical interferon to the distal portion of the long arm of chromosome. *21. J. Infect. Dis* 133, suppl. A 56
- FALCOFF, R. y FALCOFF, E. (1970) Induction of the synthesis of interferon by double-stranded RNA. II: Studies on Mengo virus replicative intermediate. *Biochem. Biophys. Acta* 199, 147
- FANTES, K.H. (1973) Purification and physicochemical properties of interferons. En: *Interferons and Interferon Inducers*. Finter, N.B. ed. North-Holland/Elsevier, 171
- FANTES, K.H., y O'NEILL, C.F. (1964) Some similarities between a viral inhibitor of plant origin and chick interferon. *Nature (London)* 203, 1048
- FENNER, F. (1976) Classification and nomenclature of viruses. Second report of the international Committee on taxonomy of viruses. *Intervirology* 7, 1
- FIELD, A.K., LAMPSON, G.P. y TYTELL, A.A. (1967) Effect of metabolic inhibitors on interferon activity. *Life Sci.* 6, 1483

- FIELD, A.K., TYTELL, A.A., LAMPSON, G.P. y HILLEMANN, M.R. (1967) Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 1004
- FINKELSTEIN, M.S., BAUSEK, G.H. y MERIGAN, T.C. (1968) Interferon inducers in vitro: difference in sensitivity to inhibitors of RNA and protein synthesis. Science 161, 465-466
- FINTER, N.B. (1964) Quantitative haemadsorption, a new assay technique. I. Assay of interferon. Virology 24, 589
- FINTER, N.B. (1965) A comparison of the amounts of mouse interferon obtained from different sources. Nature (London). 206, 597
- FINTER, N.B. (ed) (1973) Interferon and Interferon Inducers North Holland/American Elsevier New York.
- FLEISCHMAN, J., PAIN, R.H. y PORTER, R.R. (1962) Reduction of γ -globulins. Arch. Bioch. Biophys. Suppl. 1, 174
- FLOERSHEIM, G.L. (1973) Cytotoxic drugs in an avian urate microcrystal arthritis. Experientia 29, 1545
- FRAYSSINET, C., GRESSER, I., TOVEY, M. y LINDAHL, P. (1973) Inhibition effect of potent interferon preparations on the regeneration of mouse liver after partial hepatectomy. Nature (London) 245, 146
- FRIEDMAN, R.M. y COOPER, H.L. (1967) Stimulation of interferon production in human lymphocytes by mitogens. Proc. Soc. Exp Biol. Med. 125, 901
- FRIEDMAN, R.M. y PASTAN, I. (1969) Interferon and cyclic 3'5'-adenosine monophosphate: potentiation of antiviral activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 735
- FRIEDMAN, R.M. y SONNABEND, J.A. (1970) Mechanism of action of interferon. Arch. Int. Med. 126, 51
- FRIEDMAN, R.M. y KOHN, L.D. (1976) Cholera toxin inhibits interferon action. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 1078

- FROMMHAGEN, L.H.; KNIGHT, C.A. y FREEMAN, N.K. (1959) The ribonucleic acid, lipid, and polysaccharide constituents of influenza virus preparations. *Virology* 8, 176
- FULTON, F. y ARMITAGE, P. (1951) Surviving tissue suspensions for influenza virus titrations. *J. Hyg. (Lond.)* 49, 247
- FUSE, A. y KUWATA, T. (1977) Inhibition of DNA synthesis of synchronized RS₃ cells by human leucocyte interferon. *J. Nat. Cancer Inst.* 58, 891
- GADALETA, M.N.; GRECO, M. y SACCONI, C. (1970) The effect of rifampicin on mitochondrial RNA polymerase from rat liver. *FEBS Letters* 10, 54
- GALLAGHER, W.R. y BRATT, M.A. (1974) Conditional dependence of fusion from within and other cell membrane alterations by Newcastle Disease Virus. *J. Virol.* 14, 813
- GANDHI, S.S. y STEWART, R.B. (1968) Interferon production in cell cultures derived from various chick embryo tissues. *Can. J. Microbiol.* 14, 1305
- GANDHI, S.A. y BURKE, D.C. (1970) Interferon production by myxoviruses in chick embryo cells. *J. gen. Virol.* 6, 95
- GARREN, L.D., HOWELL, R.R., TOMKINS, G.M., y CROCCO, R.M. (1964) A paradoxical effect of actinomycin D: the mechanism of regulation of enzyme synthesis by hydrocortisone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52, 1121
- GERSHON, R.K. y KONDO, K. (1971) Degeneracy of the immune response to sheep red cells. *Immunology* 18, 723
- GIBSON, P.J., MEGEL, H., CAMYRE, P.K. y MICHAEL, J.G. (1976) Effect of tilorone hydrochloride on the lymphoid and interferon responses of athymic mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151, 264
- GIFFORD, G.E. y HELLER, E. (1963) Effect of actinomycin D on interferon production by "active" and "inactive" chikungunya virus in chick cells. *Nature (London)* 200, 50
- GIFFORD, G.E., TIBOR, A. y PEAVY, D.L. (1971) Interferon production in mixed lymphocyte cultures. *Infect. Immunol.* 3, 164

- GILL, H.K. y LIEW, F.Y. (1978) Regulation of delayed-type hypersensitivity. III. Effect of cyclophosphamide on the suppressor cells for delayed type hypersensitivity to sheep erythrocytes in mice. *Eur. J. Immunol.* 8, 172
- GISLER, R.H., LINDAHL, P. y GRESSER, I. (1974) Effects of interferon on antibody synthesis in vitro" *J. Immunol.* 113, 438
- GLASGOW, L.A. (1966) Leukocytes and interferon in the host response to viral infections. II. Enhanced interferon response of leukocytes from immune animal. *J. Bacteriol.* 91, 2185
- GLASGOW, L.A. y HABEL, K. (1963) Interferon production by mouse leucocytes in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 117, 149
- GOOD, R.A., GABRIELSEN, A.E., POLLARA, B., GEWURZ, H. y FINSTAD, J. (1971) Phylogenetic development of the lymphoid tissue and immunologic capacity among the lower vertebrates. En: Regulation of the antibody response. CINADER, E. Ed. Thomas, C.C. Publishers Springfield. Illinois
- GOWANS, J.L. (1971) Immunology of the small lymphocytes: En: Immunology. GOOD, R.A. y FISHER, D.E. Eds. Sinauer Assoc. Inc. Publishers, Stanford Connecticut.
- GRANGER, G.A. y WILLIAMS, T.W. (1971) En: Progress in Immunology B. Amos, ed. 437 Academic Press. New York
- GRANOFF, A. y HENLE, W. (1954) Studies on the hemolytic activity of Newcastle Disease Virus (NDV) *J. Immunol.* 72, 322
- GREEN, J.A., COOPERBAND, S.R. y KIBRICK, S. (1969) Immune specific induction of interferon production in cultures of human blood lymphocytes. *Science* 164, 1415
- GRESSER, I. (1961) Metamorphosis of human amnion cells induced by preparations of interferon. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 47, 1817
- GRESSER, I. (1972) Antitumor effects of interferon En: Advances in Cancer Research G. Klein y S. Weinhouse, Eds. 97 Academic Press, New York/London
- GRESSER, I. (1975) Interferon therapy: Obvious and not so obvious applications. *Acta Med. Scand.* 197, 49
- GRESSER, I. (1977) Antitumor effects of interferon. En: Cancer. A Comprehensive treatise (F. Becker, ed) 521, vol. 5 Plenum Press. New York-London

- GRESSER, I., BROUTY -BOYE, D., THOMAS, M.T. y MACIEIRA-COELHO, A. (1970) Interferon and cell division. I. inhibition of the multiplication of mouse leukemia L1210 cells in vitro by interferon preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 66, 1052
- GRESSER, I., BANDU, M.T., TOVEY, M., BODO, G., PAUCKER, K. y STEWART, W. (1973) Interferon and cell division. VII. Inhibitory effect of highly purified interferon preparations on the multiplication of leukemia L 1210 cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142, 7
- GRESSER, I., BANDU, M.T. y BROUTY-BOYE, D. (1974) Interferón and cell division. IX. Interferón-resistant L 1210 cells: Characteristics and origin. *J. Nat. Cancer Inst.* 52, 553
- GRESSER, I., TOVEY, M.G., MAURY, C. y CHOUROULINKOV, I. (1975) Lethality of interferon preparations for newborn mice. *Nature (London)* 258, 76
- GRESSER, I., TOVEY, M.G., BANDU, M.T., MAURY, C. y BROUTY-BOYE, D. (1976 a) Identification of the cell multiplication inhibitory factors in interferon preparations as interferons. *J. Exp. Med.* 144, 1305
- GRESSER, I., TOVEY, M.G., MAURY, C. y BANDU, M.T. (1976 b) Role of interferon in the pathogenesis of virus diseases in mice as demonstrated by the use of anti-interferon serum. II. Studies with herpes simplex, Moloney sarcoma, vesicular stomatitis, Newcastle Disease Virus and influenza viruses. *J. Exp. Med.* 144, 1316
- GRESSER, I., MAURY, C. y TOVEY, M.G. (1976) Interferon and murine leukemic. VII. Therapeutic effect of interferon preparations after diagnosis of lymphoma in AKR mice. *Int. J. Cancer* 17, 647
- GRESSER, I., MAURY, C. y TOVEY, M. (1978) Efficacy of combined interferon cyclophosphamide therapy after diagnosis of lymphoma in AKR mice. *Europ. J. Cancer* 14, 97
- GROELKE, J.W., CAMYRE, K.P. y MAYER, G.D. (1975) Enhancement of interferon production in vitro : A property of tilorone poly rI:rC/DEAE-Dextran (38685) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148, 1044
- GROLLMAN, E.F., LEE, G., AMBESI-IMPIOMBOTA, F.S., MELDOLESI, M.F. ALOJ, S.M., COON, H., HABACK, H.R. y HOHN, L.D. (1977) Effects of thyrotropin on the thyroid cell membrane: hyperpolarization induced by hormone-receptor interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 74, 235

- HAMMOND, E.M. y DVORAK, H.F. (1972) Immunologic rejection of diethylnitrosamine-induced hepatomas in strain 2 guinea pigs. Participation of basophilic leukocytes and macrophage aggregates. *J. Exp. Med.* 136, 1518
- HANNA, L., MERIGAN, T.C. y JAWETZ, E. (1966) Inhibition of TRIC agents by virus-induced interferon. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 122, 417
- HAVELL, E.A., VILCEK, J. (1972) Production of high-titered interferon in cultures of human diploid cells. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2, 476
- HAVELL, E.A., BERMAN, B., OGBURN, C.A., BERG, K., PAUCKER, K. y VILCEK, J. (1975) Two antigenically distinct species of human interferon. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 2185
- HEINE, J.W. y ADLER, W.H. (1977 a) The quantitative production of interferon by mitogen stimulated mouse lymphocytes as a function of age and its effect on the lymphocytes proliferative response. *J. Immunol.* 118, 1366
- HEINE, J.W. y ADLER, W.H. (1977 b) The kinetics of interferon production by mouse lymphocytes and its modulating effect on the virus plaque forming assay as a quantitative method to determine activated lymphocytes. *J. Immunol.* 117, 1045
- HELLER, E. (1963) Enhancement of Chikungunya virus replication and inhibition of interferon production by actinomycin D. *Virology* 21, 652
- HENDERSON, J.R. y TAYLOR, R.M. (1961) Studies on mechanism of arthropod-borne virus interference in tissue culture. *Virology* 13, 477
- HERON, I., HOKLAND, M., MOLLER-LARSEN, A. y BERG, K. (1979) The effect of interferon on lymphocyte-mediated effector cell functions: Selective enhancement of natural killer cells. *Cell. Immunol.* 42, 183
- HIERHOLZER, J. y SUGGS, M.T. (1969) Standardized viral hemagglutinations and hemagglutination-inhibition tests. *Appl. Microbiol.* 18, 816
- HIROTA, Y. y BITO, Y. (1978) The role of the thymus for maturation of transferred bursa cells into immunocompetence B cells in chickens treated with cyclophosphamide. *Immunology* 35, 889

- HO, M. (1965) Identification and induction of interferon. *Bact. Rev.* 28, 367
- HO, M. y ENDERS, J.F. (1959) Further studies on an inhibitor of viral activity appearing in infected cell cultures and its role in chronic viral infections. *Virology* 9, 446
- HO, M. y BREINING, M.K. (1962) Conditions for the production of an interferon appearing in chick cell cultures infected with Sindbis virus. *J. Immunol.* 89, 177
- HO, M. y BREINING, M.K. (1965) Metabolic determinants of interferon formation. *Virology* 25, 331
- HO, M. y KONO, Y. (1965) Effect of actinomycin D on virus and endotoxin-induced interferon like inhibitors in rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53, 220
- HO, M. y KE, Y.H. (1970) The mechanism of stimulation of interferon production by a complexed polyribonucleotide. *Virology* 40, 693
- HO, M., TAN, Y.H., ARMSTRONG, J.A. (1972) Accentuation of production of human interferon by metabolic inhibitors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 139, 259
- HO, M. y ARMSTRONG, J.A. (1975) Interferon. *Ann. Rev. Microbiol.* 29, 131
- HOFFMAN, P.F., RITTER, H.W. y KRUEGER, R.F. (1972) En: "Advances in Anti-Microbial and antineoplastic Chemotherapy" (M. Hejzlar, M. Semonsky y Másek, eds) Urban and Schwarzenberg. Munich p. 217
- HOFFMAN, W.W. y KORST, J.J., NIBLACK, J.F. y CRONIN, T.H. (1973) N,N-dioctadecyl-N',N'-bis (2-hydroxyethyl)propanediamine: antiviral activity and interferon stimulation in mice. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 3, 498
- HOLTERMAN, O.A., HILLIS, W.D. y MOFFAT, M.A.J. (1960) The development of soluble(s) and viral (v) antigens of influenza A virus in tissue culture as studied by the fluorescent antibody technique. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 50, 398
- HOMMA, M. y OHUCHI, M. (1973) Trypsin action on the growth of Sendai Virus in tissue culture cells. *J. Virol.* 12, 1457

- HORNE, R.W. y WILDY, P. (1961) Symmetry in virus architecture. *Virology* 15, 348
- HOSAKA, Y. y SHIMIZU, Y.K. (1972 a) Artificial assembly of envelope particles of HVJ (Sendai virus). I. Assembly of hemolytic and fusion factors from envelopes solubilized by nonidet P40. *Virology* 49, 627
- HOSAKA, Y. y SHIMIZU, Y.K. (1972 b) Artificial assembly of envelope particles of HVJ (Sendai virus). II. Lipid components for formation of the active hemolysin. *Virology* 49, 640
- HOSAKA, Y., SEMBA, T. y FUKAI, K. (1974) Artificial assembly of envelope particles of HVJ (Sendai virus) Fusion activity of envelope particles. *J. Gen. Virol.* 25, 391
- HOVI, T., SUNI, J., HORTLING, L. y VAHERI, A. (1978) Stimulation of chicken lymphocytes by T- and B- cell mitogens. *Cell. Immunol.* 39, 70
- HOWE, C. y MORGAN, C. (1969) Interaction between Sendai virus and human erythrocytes. *J. Virol.* 3, 70
- HUANG, K.Y., DONAHOE, R.M., GORDON, F.B. y DRESSLER, H.R. (1971) Enhancement of phagocytosis by interferon-containing preparations. *Infect. Immunity* 4, 581
- HUANG, K.Y. y DONAHOE, R.M. (1975) Effects of interferon on cells, viruses and immune system. Ed. Gerald, A. Academic Press. London-New York 381
- HUBER, R. (1976) Antibody structure. *TIBS*, 1, 174
- HUET, C., GRESSER, I., BANDU, M.T. y LINDAHL, P. (1974) Increased binding of Concanavalin A to interferon-treated murine leukemia L 1210 cells. *Proc.Soc. Exp. Biol. Med.* 147, 52
- IDA, S., HOOKS, J.J., SIRAGANIAN, R.P. y NOTKINS, A.L. (1977) Enhancement of IgE-mediated histamine release from human basophils by viruses role of interferon. *J. Exp. Med.* 145, 892
- IINUMA, M., YOSHIDA, T., NAGAI, Y., MAENO, K., MATSUMOTO, T. y HOSHINO, M. (1971) Subunits of NDV. Hemagglutinin and neuraminidase subunits of Newcastle disease virus. *Virology* 46, 663

- IMANISHI, J., YOKOTA, Y., KISHIDA, T., MUKAINAKA, T. y MATSUO, A. (1975) Phagocytosis-enhancing effect of human leukocyte interferon preparations of human peripheral monocytes in vitro. *Acta Virol.* 19, 52
- INGRAHAM, J.S. (1963) Identification individuelle des cellules productrices d'anticorps par une réaction hémolytique locale. *C.R. Acad. Sci.* 256, 5005
- ISAACS, A. (1963) Interferon. *Adv. Virus Research* 10, 1
- ISAACS, A. y LINDENMANN, J. (1957 a) Virus interference. I. The Interferon. *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B* 147, 258
- ISAACS, A. y LINDENMANN, J. (1957 b) Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B* 147, 268
- ISAACS, A. y BURKE, D.C. (1958) Mode of action of interferon. *Nature (London)* 182, 1073
- ISAACS, A., KLEMPERER, H. y HITCHCOCK, G. (1961) Studies on the mechanism of action of interferon. *Virology* 13, 191
- ISHIDA, N. y HOMMA, M. (1961) Host-controlled variation observed with Sendai virus grown in mouse fibroblast (L) cells. *Virology* 14, 486
- JAHEL, R.I., VILCEK, I., NUSSENZWIG, R. y VANDERBERG, R. (1968) Interferon inducers protect mice against *Plasmodium berghei* malaria. *Science* 161, 802
- JANKOWSKI, W., VON MUENCHHAUSEN, W., SULKOWSKI, E. y CARTER, W.A. (1976) The binding of human interferons to immobilised Cibacron Blue F3GA. Comunicación personal a Ronda, E.
- JERNE, N.K. y NORDIN, A.A. (1963) Plaque formation in agar by single antibody-producing cell. *Science* 140, 405
- JERNE, N.K., NORDIN, A.A. y HENRY, C. (1963) The agar plaque technique for recognizing antibody-producing cells. En: *Cell-Bound antibodies*. AMOS, B. y KOPROWSKI, H. 109 Wistar Institute Press
- JERNE, N.K., HENRY, C., NORDIN, A.A., FUJI, H., KOPOS, A.M.C. y LEFKOVITS, I. (1974) Plaque forming cells: Methodology and theory. *Transplant Rev.* 18, 130

- JOHNSON, H.M. (1977) Cyclic AMP regulation of mitogen induced interferon production and mitogen suppression of immune response. *Nature* 265, 154
- JOHNSON, H.M. (1978) Differentiation of the immunosuppressive and antiviral effects of interferon. *Cell. Immunol.* 36, 220
- JOHNSON, H.M., SMITH, B.G. y BARON, S. (1974) Inhibition of the primary in vitro antibody response of mouse spleen cells by interferon preparations. *Int. Res. Commun. Sys. Med. Sci.* 2, 1616
- JOHNSON, H.M. y BUKOVIC, J.A. (1975 a) Staphylococcal enterotoxin A: Inhibition of the primary in vitro antibody response to a thymus-independent antigen. *Int. Res. Commun. Sys. Med. Sci.* 3, 398
- JOHNSON, H.M., BUKOVIC, J.A. y BARON, S. (1975 b) Interferon inhibition of the primary in vitro antibody response to a thymus-independent antigen. *Cell. Immunol.* 20, 104
- JOHNSON, H.M., BUKOVIC, J.A. y SMITH, B.G. (1975 c) Inhibitory effect of synthetic poliribonucleotides on the primary in vitro immune response. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 149, 599
- JOHNSON, H.M., SMITH, B.G. y BARON, S. (1975 d) Inhibition of the primary in vitro antibody response by interferon preparations. *J. Immunol.* 114, 403
- JOHNSON, H.M. y BARON, S. (1976 a) Interferon: Effects on the immune response and the mechanisms of activation of the cellular response. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 4, 203
- JOHNSON, H.M. y BARON, S. (1976 b) The nature of the suppressive effect of interferon and interferon inducers on the in vitro immune response. *Cell. Immunol.* 25, 106
- JOHNSON, H.M., STANTON, G.J. y BARON, S. (1977) Relative ability of mitogens to stimulate production of interferon by lymphoid cells and to induce suppression of the in vitro immune response. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 154, 138
- JOKIPII, L., JOKIPII, A.M.M. y KOSUNEN, T.U. (1979) Cyclophosphamide-induced suppression of cell-mediated immunity due to antigen-specific cellular defect. *J. Clin. Lab. Immunol.* 2, 133
- JUHASZ, P.P., BENECKE, B.J. y SEIFART, K.H. (1972) Inhibition of RNA polymerases from rat liver by the semi-synthetic rifampicin derivatives. *FEBS Letters* 27, 30

- KATZ, S.I., PARKER, D., SOMMER, G. y TURK, J.L. (1974 a) Suppressor cells in normal immunization as a basic homeostatic phenomenon. *Nature* 248, 612
- KATZ, S.I., PARKER, D. y TURK, J.L. (1974 b) B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature (London)* 251 550
- KATZ, L.J., LEE, S.H.S. y ROZEE, K.R. (1975) En: Effects of interferon on cells, viruses and the immune system. (A. Geroldes, ed). 447. Academic Press. London/New York/San Francisco.
- KAUFMAN, H.E., CENTIFANTO, Y.M., ELLISON, E.D., BROWN, D.C. (1971) Effect of reserpine on the increase in myocardial adenyl cyclase activity produced by thyroid hormone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137, 367
- KAWADE, Y. (1973) Purification and characterization of mouse L cell interferon. I. Preliminary studies. *Japan. J. Microbiol* 17, 129
- KE, Y.H., SINGER, S.H., POSTIC, B. y HO, M. (1966) Effect of puromycin on virus and endotoxin-induced interferon-like inhibitors in rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121, 181
- KE, H.Y., y HO, M. (1968) Studies on physicochemical inactivation of rabbit interferon. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 129, 433
- KELLY, R.H., WOLSTENCROFT, R.A., DUMONDE, D.C. y BALFOUR, B.M. (1972) Lymphokins mediators and regulators of cellular immunity. *Clin. Exp. Immunol.* 10, 49
- KENDAL, A.P. y ECKERT, E.A. (1972) The preparation and properties of ¹⁴C-carboximido-methylated subunits from A₂/1957 influenza neuraminidase. *Biochim. Biophys. Acta* 258, 484
- KERCKHAERT, J.A., HOFHUIS, F.M. y WILLERS, J.M. (1977) Effects of variation in time and dose of cyclophosphamide injection on delayed hypersensitivity and antibody formation. *Cell. Immunol.* 29, 232
- KILBOURNE, E.D., SMART, K.M. y POKORNY, B.A. (1961) Inhibition by cortisone of the synthesis and action of interferon. *Nature (London)* 190, 650

- KILHAM, L. (1949) A Newcastle disease virus (NDV) hemolysin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 71, 63
- KILLANDER, D., LINDAHL, P., LUNDIN, L., LEARY, P. y GRESSER, I. (1976) Relationship between the enhanced expression of histocompatibility antigens on interferon-treated L 1210 cells and their position in the cell cycle. *Eur. J. Immunol.* 6, 56
- KINCADE, P.W. y COOPER, M.D. (1971) Development and distribution of immunoglobulin-containing cells in the chicken. An immuno-fluorescent analysis using purified antibodies to μ , γ y light chains. *J. Immunol.* 106, 371
- KINCADE, P.W. y COOPER, M.D. (1973) Immunoglobulin A: Site and sequence of expression in developing chicks. *Science* 179, 398
- KLEINSCHMIDT, W.J. (1972) Biochemistry of interferon and its inducers. *Annual Review of Biochemistry* 41, 517
- KLENK, H.D. y CHOPPIN, P.W. (1969) Chemical composition of the parainfluenza virus SV5. *Virology* 37, 155
- KLENK, H.D., CALIGUIRI, L.A. y CHOPPIN, P.W. (1970 a) The proteins of the parainfluenza virus SV5. II. The carbohydrate content and glycoproteins of the virion. *Virology* 42, 473
- KLENK, H.D., COMPANS, R.W. y CHOPPIN, P.W. (1970 b) An electron microscopic study of the presence or absence of neuraminic acid in enveloped viruses. *Virology* 42, 1158
- KNIGHT, E., Jr. (1973) Interferon: Effect on the saturation density to which mouse cells will grown in vitro. *J. Cell. Biol.* 56, 846
- KNIGHT, E. (1975) Heterogeneity of purified mouse interferons. *J. Biol. Chem.* 250, 4139
- KNIGHT, E. (1976) Interferon: Purification and initial characterization from human diploid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 520
- KNIGHT, E. Jr. (1976) Antiviral and cell growth inhibitory activities resides in the same glycoprotein of human fibroblast interferon. *Nature (London)* 262, 302

- KNIGHT, E., Jr. y KORANT, B.D. (1977) A cell surface alteration in mouse L cells induced by interferon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 707
- KNIGHT, E. Jr., y KORANT, B.D. (1979) Fibroblast interferon synthesis of four proteins in human fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1824
- KOHN, L.D. (1977) Relationships in the structure and function of cell surface receptors for glycoprotein hormones, bacterial toxins, and interferon. En: *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. CLARKE, F.F. Ed. vol. 12. Academic Press. New York.
- KOHN, L.D., ALOJ, S.M., FRIEDMAN, R.M., GROLLMAN, E.F., LEDLEY, F.D., LEE, G., MELDOLESI, M.J. y MULLIN, B.R. (1977) Membrane glycolipids and their relationship to the structure and function of cell surface receptors for glycoprotein hormones, bacterial toxins and interferon. En: *Advances in Carbohydrate chemistry: symposium of cell surface carbohydrate chemistry*. HARMON, R.E. Ed. Academic Press. New York.
- KOLB, J.P., POUPON, M.F., LESPITANS, G., SABOLOVIC, D. y LOISELLIER, F. (1977) Splenic modifications induced by cyclophosphamide in C₃H/He, nude and "B" mice. *J. Immunol.* 118, 1595
- KONO, Y. (1967) Interferon-like inhibitor produced in bovine leukocyte cultures after inoculation with endotoxin. *Arch. Gesamte Virusforsch* 21, 276
- KONO, Y. y HO, M. (1965) The role of the reticuloendothelial system in interferon formation in the rabbit. *Virology* 25, 163
- KRUEGER, R.F. y MAEYER, G.D. (1970) Tilorone hydrochloride: an orally active antiviral agent. *Science* 169, 1213
- KUWATA, T., FUSE, A. y MORINAGA, N. (1976) Effects of interferon on cell and virus growth in transformed human cell lines. *J. Gen. Virol.* 33, 7
- LAGRANGE, P.H., MACKANESS, G.B. y MILLER, T.E. (1974) Influence of dose and route of antigen injection on the immunological induction of T cells. *J. Exp. Med.* 139, 1529
- LASSILA, O., NURMI, T. y ESKOLA, J. (1979) Genetic differences in the mitogenic response of peripheral blood lymphocytes in the chicken. *J. Immunogenetics* 6, 37
- LAVER, W.G. (1964) Structural studies on the protein subunits from three strains of influenza virus. *J. Mol. Biol.* 9, 109

- LAVER, W.G. (1973) The polypeptides of influenza viruses. *Adv. Virus Res* 18, 57
- LAVER, W.G. y KILBOURNE, E.D. (1966) Identification in a recombinant influenza virus of structural proteins derived from both parents. *Virology* 30, 493
- LAVER, W.G. y WEBSTER, R.G. (1966) The structure of influenza viruses. IV Chemical studies of the host antigen. *Virology* 30, 104
- LAVER, W.G. y VALENTINE, R.C. (1969) Morphology of the isolated hemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus. *Virology* 38, 105
- LAWRENCE, H.S. y LANDY, M. eds. (1969) *Mediators of Cellular Immunity*. Academic Press. New York.
- LAZDINS, I., HASLAM, E.A. y WHITE, D.O. (1972) The polypeptides of influenza virus. VI Composition of the neuraminidase. *Virology* 49, 758
- LE CLERC, J.L. y COGNIAUX-LE CLERC, J. (1965) The production of interferon by two inactivated arboviruses. *Acta Virol.* 9, 18
- LEE, G., ALOJ, S.M., BRADY, R.O. y KOHN, L.D. (1976) The structure and function of glycoprotein hormone receptors: ganglioside interactions with human chorionic gonadotropin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 370
- LEONG, D., DIAZ, R., MILNER, K., ROBACH, J. y WILSON, J.B. (1970) Some structural and biological properties of Bruce-lla endotoxin. *Infect. Immun.* 1, 174
- LERMAN, S.P. y WEIDANZ, W.P. (1970) The effect of cyclophosphamide on the ontogeny of the humoral immune response in chickens. *J. Immunol.* 105, 614
- LEVINE, S., GIBSON, J.P. y MEGEL, H. (1974) Selective depletion of thymus dependent areas in lymphoid tissue by tilorone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 146, 245
- LEVY, H.B., SNELLBAKER, L. y BARON, S. (1963) Studies on the mechanism of action of interferon. *Virology* 21, 48

- LEVY, H.B., AXELROD, D. y BARON, S. (1965) Messenger RNA for interferon production. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 118, 384
- LEVY, H.B. y MERIGAN, T.C. (1966) Interferon and uninfected cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* 121, 53
- LIEBERMAN, D., VOLOCH, Z., AVIV, H. NUDEL, U y REVEL, M. (1974) Effects of interferon on hemoglobin synthesis and leukemia virus production in friend cells. *Mol. Biol. Rep.* 1, 447
- LIEBHABER, H. y TAKEMOTO, K.K. (1961) Alteration of plaque morphology of EMC virus with polycations. *Virology* 14, 502
- LINDAHL, P. (1974) Interferon treatment of mice: Enhanced expression of histocompatibility antigens on lymphoid cells. Tesis Doctoral. Universidad de Estocolmo.
- LINDHAL, P., LEARY, P. y GRESSER, I. (1972) Enhancement by interferon of the specific cytotoxicity of sensitized lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 69, 721
- LINDHAL, P., LEARY, P. y GRESSER, I. (1973) Enhancement by interferon of the expression of surface antigens on murine leukemic L1210 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 70, 2785
- LINDAHL, P., GRESSER, I., LEARY, P. y TOVEY, M. (1976) Interferon treatment of mice: enhanced expression of histocompatibility antigens on lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1284
- LINDAHL-MAGNUSSON, P., LEARY, P. y GRESSER, I. (1971) Interferon and cellular division. VI. Inhibitory effect of interferon on the multiplication of mouse embryo and mouse kidney cells in primary cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138, 1044
- LINDAHL-MAGNUSSON, P., LEARY, P. y GRESSER, I. (1972) Interferon inhibits DNA synthesis induced in mouse lymphocyte suspensions by phytohemagglutinin or by allogeneic cells. *Nature (New Biol.)* 237, 120
- LING, N.R. y KAY, J.E. (1975) Lymphocytes stimulation. North Holland Publishing Co. Amsterdam.
- LINNA, T.J., FROMMEL, D. y GOOD, R.A. (1972) Effects of early cyclophosphamide treatment on the development of lymphoid organs and immunological functions in the chickens. *Int. Arch. Allergy* 42, 20
- LIU, C. (1955) Studies on influenza infection in ferrets by means of fluorescein labelled antibody. *J. Exp. Med.* 101, 665

- LOCKART, R.Z. Jr. (1963) Production of an interferon by L cells infected with Western equine encephalomyelitis virus. *J. Bacteriol.* 85, 556
- LONG, W.F. y BURKE, D.C. (1970) The effect of infection with fowl plague virus on protein synthesis in chick embryo cells. *Biochem. J.* 110, 41
- MAEHARA, N. y HO, M. (1977) Differences in mouse interferons according to cell source and mode of induction. *Inf. Immunol.* 15, 78
- MAENO, K. y KILBOURNE, E.D. (1970) Developmental sequence and intracellular sites of synthesis of three structural protein antigens of influenza A₂ virus. *J. Virol.* 5, 153
- MAENO, K., YOSHIDA, T., IINUMA, M. NAGAI, I., MATSUMOTO, T. y ASAI, J. (1970) Isolation of hemagglutinin and neuraminidase subunits of hemagglutinating virus of Japan. *J. Virol.* 6, 492
- MAEYER, G.D. y KRUEGER, R.F. (1970) Tilorone hydrochloride mode of action. *Science* 169, 1214
- MAHDY, M.S. y HO, M. (1964) Potentiating effect of fractions of Eastern equine encephalomyelitis virus on interferon production. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 116, 174
- MARCHAL, G., MILON, G., HURTREL, B. y LAGRANGE, P.H. (1978) Titration and circulation of cells mediating delayed hypersensitivity in normal and cyclophosphamide treated mice during response to sheep red blood cells. *Immunology* 35, 981
- MARCUS, P.I. y SALB, J.M. (1966) Molecular basis of interferon action: inhibition of viral RNA translation. *Virology* 30, 502
- MARKOVITZ, H., PERSON, D.A., GITNICK, F.L. y RITTS, R.E. (1969) Immunosuppressive activity of concanavalin A. *Science* 163, 476
- MATSUMOTO, T. y MAENO, K. (1962) A host-induced modification of hemagglutinating virus of Japan (HJV, Sendai Virus) in its hemolytic cytopathic activity. *Virology* 17, 563
- MATTHEWS, R.E.F. y MAURIN, J. (1979) Classification et nomenclature des virus.- Compte rendu résumé des réunions du Comité International de Taxonomie des virus. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 130 A, 133

- MAEYER, G.D. y KRUEGER, R.F. (1970) Tilorone hydrochloride: Mode of action. *Science* 169, 1214
- MCAUSLAN, B.R. (1963) The induction and repression of thymidine kinase in the poxvirus-infected HeLa cell. *Virology* 21, 383
- MCCULLAGH, P.J. (1970) The transfer of immunological competence to rats tolerant of sheep erythrocytes with lymphocytes from normal rats. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 48, 351
- MEDZON, E.L. y VAS, S.I. (1964) Studies on in vitro antibody production. II. The effect of Newcastle disease virus on antibody synthesis. *Can. J. Microbiol.* 10, 535
- MEGEL, H., RAYCHAUDHURI, A., GOLDSTEIN, S., KINSOLVING, C.R., SHEMANO, I. y MICHAEL, J.G. (1974) Tilorone: Its selective effect on humoral and cell-mediated immunity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 145, 513
- MILLER, J.F.A.P. (1962) Effect of neonatal thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse. *Proc. R. Soc. London B* 156, 415
- MILLER, J.F.A.P. (1975) B cell-derived immunoglobulin on activated mouse T lymphocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 249, 9
- MITSUOKA, A., BABA, M. y MORIKAWA, S. (1976) Enhancement of delayed hypersensitivity by depletion of suppressor T-cells with cyclophosphamide in mice. *Nature (London)* 262, 77
- MOGENSEN, K.E. y CANTELL, K. (1974) Human leucocyte interferon: A role for disulphide bonds. *J. Gen. Virol.* 22, 95
- MORGAN, H.R., ENDERS, J.F. y WAGLEY, P.F. (1948) A hemolysin associated with the mumps virus. *J. Exp. Med.* 88, 503
- MORGAN, C., ROSE, H.M. y MOORE, D.H. (1956) Structure and development of viruses observed in the electron microscope. III. Influenza virus. *J. Exp. Med.* 104, 171
- MORGAN, C. y HOWE, C. (1968) Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. VIII. Entry of influenza virus. *J. Virol.* 2, 1122
- MOYA, M.P. (1976) Factores que intervienen en la hemaglutinación por mixovirus. Facultad de Ciencias. Universidad Complutense de Madrid. Memoria de Licenciatura.

- MULLIN, B.R., ALOJ, J.M., FISHMAN, P.H., LEE, G., KOHN, L.D. y BRADY, R.O. (1976) Cholera toxin interactions with thyrotropin receptors on thyroid plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 73, 1679
- MURPHY, J.J. y BANG, F.B. (1952) Observations with the electron microscope on cells of the chick chorioallantoic membrane infected with influenza virus. *J. Exp. Med.* 95, 259
- MYERS, M.W., FRIEDMAN, R.M. (1971) Potentiation of human interferon production by superinduction. *J. Natl. Cancer Inst.* 47, 757
- NAGANO, Y., y KOJIMA, Y. (1958) Inhibition de l'infection vaccinale par un facteur liquide dans le tissu infecté par le virus homologue. *C.R. Seances Soc. Biol. Filiales* 152, 1627
- NAKATA, Y. y BADER, J.P. (1969) The uptake of nucleosides by cells in culture. II. Inhibition by 2-mercapto-1- (β -4-pyridethyl) benzimidazole. *Biochim. Biophys. Acta* 190, 250
- NAMBA, Y., JEGASOTHY, B.V., WAKSMAN, B.H. (1977) Regulatory substances produced by lymphocytes. V. Production of inhibitor of DNA synthesis (IDS) by proliferating T lymphocytes. *J. Immunol.* 118, 1379
- NETA, R., WINKELSTEIN, A., SALVIN, S.B. y MENDELOW, H. (1977) The effect of cyclophosphamide on suppressor cells in guinea pig. *Cell. Immunol.* 33, 402
- NEURATH, A.R., VERNON, S.K., HARTZELL, R.W. y RUBIN, B.A. (1972) Haemolysis by Sendai virus: lack of requirement for neuraminidase. *J. Gen. Virol.* 16, 245
- NG, M.N. y VILCEK, J. (1972) Interferons: physicochemical properties and control of cellular synthesis. *Adv. Protein Chem.* 26, 173
- NICHOL, F.R. y TERSHAK, D.R. (1967) Effects of 5-fluorouracil and 6-azauridine on interferon action. *J. Virol.* 1, 450
- OIE, H.K., GAZDAR, A.F., BUCKLER, C.E. y BARON, S. (1972) High interferon producing line of transformed murine cells. *J. Gen. Virol.* 17, 107
- OLDSTONE, M.B. y DIXON, F.J. (1971) Tissue injury in lymphocytic choriomeningitis viral infection virus-induced immunologically specific release of a cytotoxic factor from immune lymphoid cells. *J. Exp. Med.* 134, 32

- PACHECO, D., FALCOFF, R., CATINOT, L., FLOCK, F., WERNER, G. y FALCOFF, E. (1976) Inhibitory effect of interferon on DNA and RNA synthesis in murine spleen cells stimulated by lectins. *Ann. Immunol. (Paris)* 127, 163
- PAUCKER, K., CANTELL, K. y HENLE, W. (1962) Quantitative studies on viral interference in suspended L cells. III. Effect of interfering viruses and interferon on the growth rate of cells. *Virology* 17, 324
- PAUCKER, K., BERMAN, B.J., GOLGHER, R.R. y STANCEK, D. (1970) Purification, characterization and attempts at isotopic labeling of mouse interferon. *J. Virol.* 5, 145
- PAUNESCU, E. (1970) In vivo and in vitro suppression of humoral and cellular immunological response by rifampicin. *Nature* 228, 1188
- PIERCE, J.S. y HAYWOOD, A.M. (1973) Thermal inactivation of Newcastle disease virus. *J. Virol.* 11, 168
- PLANTEROSE, D.N., BIRCH, P.J., PILCH, D.J.F. y SHARPE, T.J. (1970) Antiviral activity of double-stranded RNA and virus-like particles from *Penicillium stoloniferum*. *Nature* 227 504
- POLLEY, J.R. y GUERIN, M.M. (1957 a) The use of B-propiolactone for the preparation of virus vaccines. 1.- Selection of reaction conditions. *Canad. J. Microbiol.* 3, 863
- POLLEY, J.R. y GUERIN, M.M. (1957 b) The use of B-propiolactone for the preparation of virus vaccines. 2.- Antigenicity. *Cand. J. Microbiol.* 3, 871
- POPA, L.M., REPANOVICI, R., SAMUEL, I., SMELT, D. y PORTOCALA, R. (1975) Identification of Sendai virus neuraminidase and hemagglutinin subunits. *FEBS Letters* 51, 270
- PORTNER, A., SCROGGS, R.A., MARX, P.A. y KINGSBURY, D.W. (1975) A temperature-sensitive mutant of Sendai virus with an altered hemagglutinin-neuraminidase polypeptide: consequences for virus assembly and cytopathology. *Virology* 67. 179
- POULTER, L.W. y TURK, J.L. (1972) Proportional increase in the carrying lymphocytes in peripheral lymphoid tissue following treatment with cyclophosphamide. *Nature (London)* 238, 17.

- POUPON, M.F., KOLB, J.P. y LESPITANS, G. (1978) Induction of suppression cells in mice by cyclophosphamide. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 129 C, 475
- RAJ, N.B.K. y PITHA, P.M. (1977) Relationship between interferon production and interferon messenger RNA synthesis in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1483
- RASSMUSSEN, L.E., JORDAN, G.W., STEVENS, D.A y MERIGAN, T.C. (1974) Lymphocyte interferon production and transformation after herpes simplex infections in humans. *J. Immunol.* 112, 728
- REED, L.J. y MUENCH, H. (1938) A simple method of estimating 50% end points. *Amer. J. Hyg.* 27, 493
- REICH, E., FRANKLIN, R.M., SHATKIN, A.J. y TATUM, E.F. (1962) Action of actinomycin D on animal cells and viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48, 1238
- REINICKE, V. (1964) The influence of hydrocortisone and production of influenza virus and interferon in ovo. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 60, 528
- REINICKE, V., MORDHORST, C.H. y SCHONNE, E. (1967) In ovo inhibition of the growth of TRIC agents by purified species-specific interferon. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 69, 478
- REMLINGTON, J.S. y MERINGA, T.C. (1968) Interferon: Protection of cells infected with an intracellular protozoan (*Toxoplasma gondii*). *Science (Washington)* 161, 804
- REYNOLDS, F.H. Jr. y PITHA, P. M. (1974) The induction of interferon and its messenger RNA in human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 59, 1023
- RICH, R.R. y PIERCE, C.W. (1973) Biological expressions of lymphocyte activation. I. Effects of phytohemagglutinin on antibody synthesis in vitro. *J. Exp. Med.* 137, 205
- RIVIERE, Y., GRESSER, I., GUILLON, J.C. y TOVEY, M.G. (1977) Inhibition by anti-interferon serum of lymphocytic choriomeningitis virus disease in suckling mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2135
- RODGERS, R., y MERIGAN, T.C. (1972) Interferon and its inducers: Antiviral and other effects. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 3, 131

- ROHOOSKY, M.W., NEWBERNE, J.W. y GIBSON, J. P. (1970) Effects of an oral interferon-inducer on the hematopoietic and reticuloendothelial systems. *Toxicol. Appl. Pharmacology* 17, 556
- ROMBALL, C.G. y WEIGLW, W.O. (1975) The enhancing effect of mitogens on the in vivo immune response of rabbits. *J. Immunol.* 11, 556
- RONDA, E. y ALONSO, M.L. (1974) Interferon levels in presence of rifamycin molecules. *Progress in Chemoth.* II, 1005
Ed. E. Daikos-Athens
- RONDA, E., ALONSO, M.L. y BARASOAIN, I. (1976) In vivo depression of either endotoxin on virus-induced interferons by rifamycin and rifampicin derivatives. *Chemotherapy* vol. VI p. 327. Ed. J.D. Williams y A.M. Geddes. Plenum Press. New York & London
- RONDA, E., ALONSO, M.L. y MOYA, M.P. (1978) Comparative study of cyclophosphamide effect on interferon induction and immune response in chickens. *Comunicación al I Mediterranean Congress of Chemotherapy*. Madrid.
- ROSSMAN, T.G. (1968) Some factors influencing interferon synthesis and action in relation to induction in animal cells. Doctoral (Ph.D.) Thesis. Universidad de New York 102
- ROSSMAN, T.G. y VILCEK, J. (1968) The blocking of interferon action by a serum component. *Bacteriol. Proc.* 1968, 147
- ROTT, R. (1977) The structural basis of the function of influenza virus glycoproteins. *Med. Microb. Immunol.* 164, 23
- ROTT, R. y KLENK, H.D. (1977) Structure and assembly of viral envelopes. *Cell. Surface Rev.* 2, 47
- ROZEE, K.R., LEE, S.H.S. y NGAN, J. (1973) Effect of priming on interferon inhibition of Con A induced spleen cells blastogenesis. *Nat. New Biol.* 245, 16
- RUBIN, H. (1957) Interactions between Newcastle disease virus (NDV) antibody and cell. *Virology* 4, 533

- SALAMAN, M.H. (1969) Immunodepression by viruses En: "The immune response and its suppression". Ed. SORKIN, E., DE WECK S. Karger, Basel (Suiza)
- SALK, J.E. (1944) A simplified procedures for titrating haemagglutinating capacity of influenza virus and the corresponding antibody. *J. Immunol.* 49, 87
- SALVIN, S.B., YOUNGNER, J.S. y LEDERER, W.H. (1973) Migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity. *Infect. Immunol.* 7, 68
- SALVIN, S.B., NISHIO, J. y SHONNARD, J.T. (1974) Two new inhibitory activities in blood of mice with delayed hypersensitivity after challenge with specific antigen. *Infect. Immunol.* 9 631
- SALVIN, S.B., RIBI, E., GRANGER, D.L. y YOUNGNER, J.S. (1975) Migration inhibitory factor and type II . Interferon in the circulation of mice sensitized with mycobacterial components. *J. Immunol.* 114, 354
- SAMUEL, C.E. y JOKLIK, W.K. (1974) A protein synthesizing system from interferon-treated cells that discriminates between cellular and viral messenger RNAs. *Virology* 58, 476
- SANTOS, G.W. y OWENS, A.H.J. (1966) 19 S y 7 S antibody production in the cyclophosphamide or methotrexate treated rat. *Nature (London)* 209, 622
- SCHAFER, W. (1963) En "The viruses" BURNET, F.M. y STANLEY, W. M. Eds. Vol. 1, 175. Academic Press. New York
- SCHEID, A., CALIGUIRI, L.A. COMPANS, R.W. y CHOPPIN, P.W. (1972) Isolation of paramyxovirus glycoproteins. Association of both hemagglutinating and neuraminidase activities with the larger SV5 glycoprotein. *Virology* 50, 640
- SCHEID, A. y CHOPPIN, P.W. (1973) Isolation and purification of the envelope proteins of Newcastle disease virus. *J. Virol.* 11, 263
- SCHEID, A. y CHOPPIN, P.W. (1974) Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion hemolysis, and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology* 57, 475

STITZ

- SHELLEKENS, H., WEIMAR, W., CANTELL, K. y STITZ, L. (1979) Antiviral effect of interferon in vivo may be mediated by the host. *Nature* 278, 742
- SCHIFF, G.M., LINNEMAN, C.C. Jr., ROTTE, T., MAYER, G. y TRIMBLI, S. (1973) Effect of tilorone. HCl against rubella virus challenge in humans. *Clin. Rev.* 21, 882
- SCHMIDTKE, J.R. y JOHNSON, A.G. (1971) Regulation of the immune system by synthetic polynucleotides. I. Characterization of adjuvant action on antibody synthesis. *J. Immunol.* 106, 1191
- SCHONNE, E. (1966) Properties of rat tumour interferon. *Biochim. Biophys. Acta* 115, 429
- SCHONNE, A., BILLIAU, A. y DE SOMER, P. (1970) The properties of interferon. IV. Isoelectric focusing of rabbit interferon. In: *Symp. Immunobiol. Stand.* 14, 61
- SCHWARTZ, A.I., ORBACH-ARBOUYS, S. y GERSHORN, R.K. (1976). Participation of cyclophosphamide sensitive T-cells in graft vs-host reactions. *J. Immunol.* 117, 871
- SETO, J.T. y ROTT, R. (1966) Functional significance of sialidase during influenza virus multiplication. *Virology* 30, 731
- SETO, J.T., BECHT, H. y ROTT, R. (1974) Effect of specific antibodies on biological functions of the envelope components of Newcastle disease virus. *Virology* 61, 354
- SEHGAL, P.B., TAMM, I. y VILCEK, J. (1975) Human interferon production: Superinduction by 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole. *Science* 190, 282
- SEHGAL, P.B. y TAMM, I. (1976) An evaluation of messenger RNA competition in the shutoff of human interferon production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1621
- SEHGAL, P.B., TAMM, I. y VILCEK, J. (1976) Regulation of human interferon production. I. Superinduction by 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosyl-benzimidazole. *Virology* 70, 532
- SEHGAL, P.B., DOBBERSTEIN, B. y TAMM, I. (1977) Interferon messenger RNA content of human fibroblasts during induction, shutoff and superinduction of interferon production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3409

- SEHGAL, P.B., LYLES, D.S. y TAMM, I. (1978) Superinduction of human fibroblast interferon production: Further evidence of increased stability of interferon mRNA. *Virology* 89, 186
- SEVER, J.L. (1962) Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunol.* 88, 320
- SHARPE, T.J., BIRCH, P.J. y PLANTEROSE, D.N. (1971) Resistance to virus infection during the hyporeactive state of interferon induction. *J. Gen. Virol.* 12, 331
- SHEAFF, E.T. y STEWART, R.B. (1969) Interaction of interferon with cells: induction of antiviral activity. *Can. J. Microbiol.* 15, 941
- SHIMIZU, K., HOSAKA, Y. y SHIMIZU, Y.K. (1972) Solubilization of envelopes of HVJ (Sendai virus) with alkali-emasol reagent and reassembly of envelope particles with removal of the detergent. *J. Virol.* 9, 842
- SHIMIZU, K., SHIMIZU, Y.K., KOHAMA, T. y ISHIDA, N. (1974) Isolation and characterization of two distinct types of HVJ (Sendai Virus) spikes. *Virology* 62, 90
- SKEHEL, J.J., HAY, A.J., BURKE, D.C. y CARTWRIGHT, L.N. (1967) Effects of actinomycin D and 2-mercapto-1-(β -4-pyridethyl) benzimidazole on the incorporation of ^3H -uridine by chick embryo cells. *Biochim. Biophys. Acta* 142, 430
- SMITH, B.G. y JOHNSON, H.M. (1975) The effect of staphylococcal enterotoxins on the primary in vitro immune response. *J. Immunol.* 115, 575
- SMITH, R.T., MIESCHER, P.A. y GOOD, R.A. Eds. (1966) *Phylogeny of immunity* U. Florida Press. Gainesville, Fla.
- SONNABEND, J.A. y FRIEDMAN, R.M. (1973) Mechanisms of interferon action En: *Interferons and Interferon Inducers*. N.B. Finter, Ed 201 North-Holland. Amsterdam/London
- SONNENFELD, G., MANDEL, A.D. y MERIGAN, T.C. (1977) Immunomodulating activity and characterization of type II interferon. *Fed. Proc.* 36, 1229
- SRB, V., PUZA, V., SPURNA, V. y KEPRTOVA, J. (1974) Action of rifampicin on stabilized cell lines HEP-2 and HeLa. *Experientia* 30, 484

- STEWART, W.E., II., GOSSER, L.B. y LOCKHART, R.Jr. (1971)
Priming: A nonantiviral function of interferon. *J. Virol.* 7, 792
- STEWART, W.E., DE CLERCQ, E. y DE SOMER, P. (1974) Stabilisation of interferons by defensive reversible denaturation. *Nature (London)* 249, 460
- STEWART, W.E., DESMYTER, J. (1975) Molecular heterogeneity of human leukocyte interferon: two populations differing in molecular weights, requirements for renaturation, and cross-species antiviral activity. *Virology* 67, 68
- STEWART, W.E., II. GRESSER, I., TOVEY, M.G., BANDU, M.T. y LE GOFF, S. (1976) Identification of the cell multiplication inhibitory factors in interferon preparations as interferons. *Nature (London)* 262, 300
- ST. GEME, J.W., HERRIGAN, D.S. y TOYAMA, P.S. (1969) The effect of 6-mercapto-purine on the synthesis and action of interferon. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130, 852
- STINEBRING, W.R. y ABSHER, P.M. (1970) Production of interferon following an immune response. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 173, 714
- STOBO, J., GREEN, I., JACKSON, L. y BARON, S. (1974) Identification of a subpopulation of mouse lymphoid cells required of interferon production after stimulation with mitogens. *J. Immunol.* 112, 1589
- STRANDER, H., CANTELL, K. (1967) Further studies on the production of interferon by human leukocytes in vitro. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* 45, 20
- STRANDER, H., CANTELL, K., CARLSTROM, G. y JAKOBSSON, P.A. (1973)
a) Clinical and laboratory investigations on man: systemic administration of potent interferon to man. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 733
- STRANDER, H., JAKOBSSON, P.A., CARLSTROM, G. y CANTELL, K. (1973)
b) Administration of potent interferon to patients with malignant diseases. *Cancer Cytol.* 13, 18

- STRANDER, H., CANTELL, K., INGIMARSSON, S., JAKOBSSON, P.A., NILSSON, U. y SODERBERG, G. (1977) Interferon treatment of osteogenic sarcoma: a clinical trial. En: Modulation of Host Immune Resistance in the prevention and treatment of induced neoplasia. 377 . Chirigos, M.S. (ed.) Fogarty International Center Proceedings (vol. 28) Government Printing Office. Washington. D.C.
- STRINGFELLOW, D.A. y GLASGOW, L.A. (1972) Tilorone hydrochloride: an oral interferon-inducing agent. Antimicrobiol. Agents Chemother. 2, 73
- STRINGFELLOW, D.A., OVERALL, J.C. Jr., y GLASGOW, L.A. (1974) Interferon inducers in therapy of infection with encephalomyocarditis virus in mice. I. Effect of single doses of Polyriboinosinic-polyribocytidylic acid and tilorone hydrochloride on viral pathogenesis. J. Infec. Dis. 130, 470
- STUTMAN, O. (1975) Thymus, autoimmunity and the involution of the lymphoid system. Ann. N.Y. Acad. Sci. 249, 89
- STUTMAN, O. (1976) Cell interactions in the suppression of in vitro antibody responses. Ad. Cancer Res. 22, 261
- SUBRAHMANYAN, T.P. y MINUS, C.A. (1966) Fate of intravenously administered interferon and the distribution of interferon during virus infections in mice. Brit. J. Exp. Pathol. 47, 168
- SUELTFUSS, E.A. y POLLARD, M. (1963) Cytochemical assay of interferon produced by duck hepatitis virus. Science (Washington) 139, 595
- SUGIYAMA, M., YAMAMOTO, K., KINOSHITA, Y., KIMURA, S., WATANABE, M. y SHIBATA, T. (1972) The producing ability of interferon in the lymphocytes separated from the human tonsils. Jap. J. Tonsil. 11, 106
- SULKOWSKI, E., DAVEY, M.W. y CARTER, W.A. (1976) Interaction of human interferons with immobilised hydrophobic amino acids and dipeptides. J. Biol. Chem. 251, 5381
- SUNG, S.Ch. (1974) Inhibitors of RNA and DNA biosynthesis. Life Sciences 15, 359
- SUTTON, R.N.P. y TYRRELL, D.A.J. (1961) Some observations on interferon prepared in tissue cultures. Brit. J. Exp. Pathol. 42, 99

- TAKATSY, G., FURESZ, J. y FARKAS, F. (1954) Studies on the quantitative relationships of influenza virus antibody union by means of a simple antibody absorption test. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 5, 241
- TAMAOKI, T., y MUELLER, G.C. (1963) Effect of puromycin on RNA synthesis in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 11, 404
- TAMM, I. y SEHGAL, P.B. (1978) Halobenzimidazole ribosides and RNA synthesis of cells and viruses. *Adv. Virus Res.* 22, 187
- TAN, Y. H. (1976) Chromosome 21 and the cell growth inhibitory effect of human interferon preparations. *Nature (London)* 260, 141
- TAN, Y.H., ARMSTRONG, J.A., KE, Y.H., HO, M. (1970) Regulation of cellular interferon production: enhancement by antimetabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 464
- TAN, Y.H., ARMSTRONG, J.A. y HO, M. (1971 a) Accentuation of interferon production by metabolic inhibitors and its dependence on protein synthesis. *Virology* 44, 503
- TAN, Y.H., ARMSTRONG, J.A. y HO, M. (1971 b) Intracellular interferon: Kinetics of formation and release. *Virology* 45, 837
- TAN, Y.H., TISCHFIELD, J. y RUDDLE, F.H. (1973) The linkage of genes for the human interferon-induced antiviral protein and indophenol oxidase-B traits to chromosome G-21. *J. Exp. Med.* 137, 317
- TAN, Y.H., CREAGAN, R.P. y RUDDLE, F.H. (1974) Regulation of cellular interferon production: enhancement by antimetabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 2251
- TAYLOR, J.M., HAMPSON, A.W., LAYTON, J.E. y WHITE, D.O. (1970) The polypeptides of influenza virus. IV. An analysis of nuclear accumulation. *Virology* 42, 744
- TOIVANEN, P., TOIVANEN, A. y GOOD, R.A. (1972) Ontogeny of bursal function in chicken. I. Embryonic stem cell for humoral immunity. *J. Immunol.* 109, 1058

- TOMKINS, G.M., THOMPSON, E.B., HAYASHI, S., GELEHRTER, T., GRANNER, D., PETERKOFISKY, D. (1966) Tyrosine transaminase induction in mammalian cells in tissue culture. Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 349
- TOMKINS, G.M., LEVINSON, B.B., BAXTER, J.D., DETHLEFSEN, L. (1972) Further evidence for posttranscriptional control of inducible tyrosine aminotransferase synthesis in cultured hepatoma cells. Nature (New Biol) 239, 9
- TOVEY, M., BROUTY-BOYE, D. y GRESSER, I. (1975) Early effect of interferon on mouse leukemic cells cultivated in a chemostat. Proc. Natl.Acad. Sci. USA 72, 2265
- TOZAWA, H., WATANABE, M. y ISHIDA, N. (1973) Structural components of Sendai virus. Serological and physicochemical characterization of hemagglutinin subunits associated with neuraminidase activity. Virology 55, 242
- TRAVER, M.I., NORTHROP, R.L. y WALKER, D.L. (1960) Site of intracellular antigen production by myxoviruses. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104, 268
- TURK, J.L. y POULTER, L.W. (1972) Selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide. Clin. Exp. Immunol. 10, 285
- VALLE, M.J., BOBROVE, A.M., STROBER, S. y MERIGAN, T.C. (1975 a) Immune specific production of interferon by human T cells in combined macrophage-lymphocyte cultures in response to herpes simplex antigen. J. Immunol. 114, 435
- VALLE, M.J., JORDAN, G.W., HAAR, S. y MERIGAN, T.C. (1975 b) Characteristics of immune interferon produced by human lymphocyte cultures compared to other human interferons. J. Immunol. 115, 230
- VAN PUTTEN, L.M. y LELIEVELD, P. (1970) Factors determining cell killing by chemotherapeutic agents in vivo, I. Cyclophosphamide. Eur. J. Cancer 3, 313
- VAN ROSSUM, W. y DE SOMER, P. (1966) Some aspects of the interferon production in vivo. Life Sci. 5, 105
- VIGNAUX, F. y GRESSER, I. (1977) Differential effects of interferon on the expression of H-2K; H-2D and I_c antigens on mouse lymphocytes. J. Immunol. 118, 721

- VILCEK, J. (1964) Production of interferon by newborn and adult mice infected with Sindbis virus. *Virology* 22, 651
- VILCEK, J. (1970) Metabolic determinants in the induction of interferon by a synthetic double stranded polynucleotide in rabbit kidney cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 173, 390
- VILCEK, J. y RADA, B. (1962) Studies on an interferon from tickborne encephalitis virus infected cells. III. Anti-viral action of interferon. *Acta Virol.* 6, 9
- VILCEK, J. y LOWY, D.R. (1967) Interaction of interferon with chick embryo cells. *Arch. Gesamte Virusforsch* 21, 253
- VILCEK, J., NG, M.H. y ROSSMAN, T.G. (1967) Studies on the action of interferon in cellular and cell-free systems. En: *The interferons*. RITA, G. Ed. Academic Press, New York, 1968 185 p.
- VILCEK, J. y FRIEDMAN-KIEN, A.E. (1968) Effect of insulin on virus plaque formation, interferon synthesis and action. Citada por VILCEK, J. en "Interferon" Springer-Verlag, New York, 78 p.
- VILCEK, J., ROSSMAN, T.G., VARACALLI, F. (1969) Differential effects of actinomycin D and puromycin on the release of interferon induced by double stranded RNA. *Nature (Lond.)* 222, 682
- VILCEK, J. y NG, M.H. (1971) Post-transcriptional control of interferon synthesis. *J. Virol.* 7, 588
- VILCEK, J. y HAVELL, E.A. (1973) Stabilization of interferon-messenger RNA activity by treatment of cells with metabolic inhibitors and lowering of the incubation temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3909
- VILCEK, J., HAVELL, E.A. y KOHASE, M. (1975) Superinduction of interferon with metabolic inhibitors: possible mechanisms and practical applications. *J. Infect. Dis* 133 Suppl. A22
- VIRELIZIER, J.L., VIRELIZIER, A.M., y ALLISON, A.C. (1976) The role of circulating interferon in the modifications of immune responsiveness by mouse hepatitis virus (MHV-3) *J. Immunol.* 117, 748

- WAGNER, R.R. (1961) Biological studies of interferon. I. Suppression of cellular infection with Eastern equine encephalomyelitis virus. *Virology* 13, 323
- WAGNER, R.R. (1963) The interferons: cellular inhibitors of viral infection. *Ann. Rev. Microbiol.* 17, 285
- WAGNER, R.R., y HUANG, A.S. (1965) Reversible inhibition of interferon synthesis by puromycin. Evidence for an interferon-specific messenger RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 1112
- WAINBERG, M.A. y HOWE, C. (1973) Factor affecting cell fusion induced by Sendai virus. *J. Virol.* 12, 937
- WAKSMAN, B.H. y NAMBA, Y. (1976) On soluble mediators of immunologic regulation. *Cell. Immunol.* 21, 161
- WALLEN, W.C., DEAN, J.H. y LUCAS, D.O. (1973) Interferon and the cellular immune response: Separation of interferon producing cells from DNA synthetic cells. *Cell. Immunol.* 6, 110
- WALLEN, W.C., DEAN, J.H., GAUNTT, C. y LUCAS, D.O. (1975) Suppression of lymphocyte stimulation in mouse spleen cells by interferon preparations. En: *Effects of interferon on cells, viruses and the immune system*. Ed. Gerald, A., Academic Press. London 355
- WALTERS, S., BURKE, D.C. y SKEHEL, J.J. (1967) Interferon production and RNA inhibitors. *J. Gen. Virol.* 1, 349
- WARD, P.A., REMOLD, H.G. y DAVID, J.R. (1970) Production by antigen stimulated lymphocytes of a leukotactic factor distinct from migration inhibitory factor. *Cell. Immunol.* 1, 162
- WATERSON, A.P. (1962) Two kinds of myxovirus. *Nature (London)* 193, 1163
- WATERSON, A.P. y ALMEIDA, J.D. (1966) Taxonomic implications of myxovirus. *Nature (London)* 210, 1138
- WATSON, B.K. y COONS, A.H. (1954) Studies of influenza virus infection in the chick embryo using fluorescent antibody. *J. Exp. Med.* 99, 419

- WATSON, J., EPSTEIN, R., NAKOINZ, I. y RALPH, P. (1971) The role of humoral factors in the initiation of in vitro primary responses. II. Effects of lymphocyte mitogens. *J. Immunol.* 110, 43
- WEHRLI, W., NUESCH, J., KNUSEL, F. y STAEHELIN, M. (1968) Action of rifamycin on RNA polymerase. *Biochim. Biophys. Acta* 157, 215
- WEIL, R. y DORNER, F. (1973) Interferon structure: Facts and speculation. En: Selective inhibitors of viral functions. Carter, W.A. Ed. C.R.C. Press, 107
- WESTPHAL, O. y JANN, K. (1965) Bacterial lipopolysaccharides: Extraction with fenol-water and further applications of the procedures. En: Methods in carbohydrate chemistry 5, 83 Academic Press, New York
- WHEELLOCK, E.F. (1965) Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 149, 310
- WHITE, D.O., TAYLOR, J.M., HASLAM, E.A. y HAMPSON, A.W. (1970) The polypeptides of influenza virus and their biosynthesis. En: The biology of large RNA viruses. BARRY, R.D. y MAHY, B.W.J. Eds. p. 602. Academic Press. New York.
- WHITEHOUSE, M.W. y HASLAM, J.M. (1962) Ability of some antirheumatic drugs to uncouple oxidative phosphorylation. *Nature* (London) 196, 1323
- WIEBE, M.E. y JOKLIK, W.K. (1975) The mechanism of inhibition of reovirus. Replication by interferon. *Virology* 66, 229
- WILCOX, W.C. (1959) Quantitative aspects of an in vitro virus induced toxic reaction I. General aspects of the reaction of Newcastle disease virus with L cells. *Virology* 9, 3
- WILLEMS, M. y PENMAN, S. (1966) The mechanism of host cell protein synthesis inhibition by poliovirus. *Virology* 30, 355
- WILLIAMSON, A.R. (1976) The biological origin of antibody diversity. *Ann. Rev. Biochem.* 45, 467
- WILLIERS, J.M. y SLVIS, E. (1975) The influence of cyclophosphamide on antibody formation in the mouse. *Ann. Immunol.* 126 C, 267

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (O.M.S.) (1973) Inmunidad celular y resistencia a las infecciones. Serie de Informes Técnicos de la O.M.S.
- WRIGLEY, N.G., SKEHEL, J.J., CHARLWOOD, P.A. y BRAND, C.M. (1973) The size and shape of influenza virus neuraminidase. *Virology* 51, 525
- YARMOLINSKY, M. y DE LA HABA, G. (1959) Inhibition by puromycin of amino acid incorporation into protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45, 1721
- YARON, M., YARON, I., GURARI-ROTMAN, D., REVEL, M., LINDNER, H.R. y ZOR, U. (1977) Stimulation of prostaglandin E production in cultured human fibroblast by poly (I): poly (C) and human interferon. *Nature (London)* 267, 457
- YOUNGNER, J.S. (1970 a) Influence of inhibitors of protein synthesis on interferon formation in mice. II. Comparison of effects of glutarimide antibiotics and tenuazonic acid. *Virology* 40, 335
- YOUNGNER, J.S. (1970 b) Interferon production by nonviral stimuli of microbial origin. *J. Gen. Physiol* 56, Suppl. 25 S
- YOUNGNER, J.S. y STINEBRING, W.R. (1964) Interferon production in chickens injected with *Brucella abortus*. *Science (Washington)* 144, 1022
- YOUNGNER, J.S., STINEBRING, W.R., TAUBE, S.G. (1965) Influence of inhibitors of protein synthesis on interferon formation in mice. *Virology* 27, 541
- YOUNGNER, J.S. y HALLUM, J.V. (1968) Interferon production in mice by double-stranded polynucleotides: induction or release? *Virology* 35, 177
- YOUNGNER, J.S. y HALLUM, J.V. (1969) Inhibition of induction of interferon synthesis in L cells pretreated with interferon. *Virology* 37, 473
- YOUNGNER, J.S. y SALVIN, S.B. (1973) Productions and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity. *J. Immunol.* 111, 1914

ZBINDEN, G. y EMCH, E. (1972) Effect of tilorone hydrochloride an oral interferon inducer, on leukopoiesis in rats. Acta haemat. (Loz) 47, 49

ZINOBER, M.R., PIRTLE, E.C. (1971) Tilorone dihydrochloride as an interferon inducer in rabbits and piglets. Interferon Sci. Memo. 509

ZSCHIESCHE, W. y AUGSTEN, K. (1970) Influence of RES (reticulo-endothelial system) stimulating and immunosuppressive agents on experimental amyloidosis in mice. Proc. 6th Int. Meet. Reticuloendothel. Soc. Freiburg. Abst. 162

